

P A T E N T COOPERATION TREAT Y

PCT

NOTIFICATION OF ELECTION

(PCT Rule 61.2)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

Commissioner
 US Department of Commerce
 United States Patent and Trademark
 Office, PCT
 2011 South Clark Place Room
 CP2/5C24
 Arlington, VA 22202
 ETATS-UNIS D'AMERIQUE
 in its capacity as elected Office

Date of mailing (day/month/year) 14 March 2001 (14.03.01)	
International application No. PCT/JP00/04595	Applicant's or agent's file reference F2000-55-PCT
International filing date (day/month/year) 10 July 2000 (10.07.00)	Priority date (day/month/year) 08 July 1999 (08.07.99)
Applicant SHIMA, Midori et al	

1. The designated Office is hereby notified of its election made:

☒ in the demand filed with the International Preliminary Examining Authority on:
 23 January 2001 (23.01.01)

☐ in a notice effecting later election filed with the International Bureau on:

2. The election ☒ was
☐ was not

made before the expiration of 19 months from the priority date or, where Rule 32 applies, within the time limit under Rule 32.2(b).

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland Facsimile No.: (41-22) 740.14.35	Authorized officer Henrik Nyberg Telephone No.: (41-22) 338.83.38
---	---

PCT COOPERATION TREATY

PCT

From the INTERNATIONAL BUREAU

NOTIFICATION OF THE RECORDING
OF A CHANGE(PCT Rule 92bis.1 and
Administrative Instructions, Section 422)

To:

HATTA, Mikio
Dia Palace Nibancho
11-9, Nibancho
Chiyoda-ku
Tokyo 102-0084
JAPON

Date of mailing (day/month/year) 16 January 2001 (16.01.01)	IMPORTANT NOTIFICATION
Applicant's or agent's file reference F2000-55-PCT	
International application No. PCT/JP00/04595	International filing date (day/month/year) 10 July 2000 (10.07.00)

1. The following indications appeared on record concerning:

☒ the applicant

 ☐ the inventor

 ☐ the agent

 ☐ the common representative

Name and Address

State of Nationality

State of Residence

Telephone No.

Facsimile No.

Teleprinter No.

2. The International Bureau hereby notifies the applicant that the following change has been recorded concerning:

☒ the person

 ☐ the name

 ☐ the address

 ☐ the nationality

 ☐ the residence

Name and Address

State of Nationality

State of Residence

CHISSO CORPORATION
6-32, Nakanoshima 3-chome
Kita-ku
Osaka-shi
Osaka 530-0005
Japan

JP

JP

Telephone No.

Facsimile No.

Teleprinter No.

3. Further observations, if necessary:

The applicant identified in Box 2 should be included on the record as an additional applicant for all designated States except US.

4. A copy of this notification has been sent to:

<input checked="" type="checkbox"/> the receiving Office	<input checked="" type="checkbox"/> the designated Offices concerned
<input type="checkbox"/> the International Searching Authority	<input type="checkbox"/> the elected Offices concerned
<input type="checkbox"/> the International Preliminary Examining Authority	<input type="checkbox"/> other:

The International Bureau of WIPO
34, chemin des Colombettes
1211 Geneva 20, Switzerland

Authorized officer

Susumu Kubo

Facsimile No.: (41-22) 740.14.35

Telephone No.: (41-22) 338.83.38

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

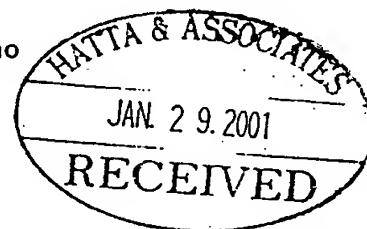
NOTIFICATION OF THE RECORDING OF A CHANGE

(PCT Rule 92bis.1 and
Administrative Instructions, Section 422)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

HATTA, Mikio
Dia Palace Nibancho
11-9, Nibancho
Chiyoda-ku
Tokyo 102-0084
JAPON



Date of mailing (day/month/year) 16 January 2001 (16.01.01)	
Applicant's or agent's file reference F2000-55-PCT	IMPORTANT NOTIFICATION
International application No. PCT/JP00/04595	International filing date (day/month/year) 10 July 2000 (10.07.00)

1. The following indications appeared on record concerning:

☒ the applicant
 ☐ the inventor
 ☐ the agent
 ☐ the common representative

Name and Address

State of Nationality

State of Residence

Telephone No.

Facsimile No.

Teleprinter No.

2. The International Bureau hereby notifies the applicant that the following change has been recorded concerning:

☒ the person
 ☐ the name
 ☐ the address
 ☐ the nationality
 ☐ the residence

Name and Address

CHISSO CORPORATION
6-32, Nakanoshima 3-chome
Kita-ku
Osaka-shi
Osaka 530-0005
Japan

State of Nationality

JP

State of Residence

JP

Telephone No.

Facsimile No.

Teleprinter No.

3. Further observations, if necessary:

The applicant identified in Box 2 should be included on the record as an additional applicant for all designated States except US.

4. A copy of this notification has been sent to:

☒ the receiving Office
 ☒ the designated Offices concerned
☐ the International Searching Authority
 ☐ the elected Offices concerned
☐ the International Preliminary Examining Authority
 ☐ other:

The International Bureau of WIPO
34, chemin des Colombettes
1211 Geneva 20, Switzerland

Facsimile No.: (41-22) 740.14.35

Authorized officer

Susumu Kubo

Telephone No.: (41-22) 338.83.38

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

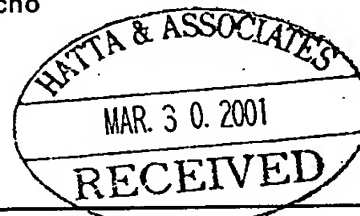
INFORMATION CONCERNING ELECTED
OFFICES NOTIFIED OF THEIR ELECTION

(PCT Rule 61.3)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

HATTA, Mikio
Dia Palace Nibancho
11-9, Nibancho
Chiyoda-ku
Tokyo 102-0084
JAPON



Date of mailing (day/month/year)

14 March 2001 (14.03.01)

Applicant's or agent's file reference

F2000-55-PCT

IMPORTANT INFORMATION

International application No.

PCT/JP00/04595

International filing date (day/month/year)

10 July 2000 (10.07.00)

Priority date (day/month/year)

08 July 1999 (08.07.99)

Applicant

FUJIMORI KOGYO CO., LTD. et al

1. The applicant is hereby informed that the International Bureau has, according to Article 31(7), notified each of the following Offices of its election:

AP : GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW

EP : AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE

National : AU, BG, CA, CN, CZ, DE, IL, JP, KP, KR, MN, NO, NZ, PL, RO, RU, SE, SK, US

2. The following Offices have waived the requirement for the notification of their election; the notification will be sent to them by the International Bureau only upon their request:

EA : AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM

OA : BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG

National : AE, AG, AL, AM, AT, AZ, BA, BB, BR, BY, BZ, CH, CR, CU, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB,
GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IN, IS, KE, KG, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MW,
MX, MZ, PT, SD, SG, SI, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, UZ, VN, YU, ZA, ZW

3. The applicant is reminded that he must enter the "national phase" before the expiration of 30 months from the priority date before each of the Offices listed above. This must be done by paying the national fee(s) and furnishing, if prescribed, a translation of the international application (Article 39(1)(a)), as well as, where applicable, by furnishing a translation of any annexes of the international preliminary examination report (Article 36(3)(b) and Rule 74.1).

Some offices have fixed time limits expiring later than the above-mentioned time limit. For detailed information about the applicable time limits and the acts to be performed upon entry into the national phase before a particular Office, see Volume II of the PCT Applicant's Guide.

The entry into the European regional phase is postponed until 31 months from the priority date for all States designated for the purposes of obtaining a European patent.

The International Bureau of WIPO
34, chemin des Colombettes
1211 Geneva 20, Switzerland

Facsimile No. (41-22) 740.14.35

Authorized officer:

Henrik Nyberg

Telephone No. (41-22) 338.83.38

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

NOTICE INFORMING THE APPLICANT OF THE COMMUNICATION OF THE INTERNATIONAL APPLICATION TO THE DESIGNATED OFFICES

(PCT Rule 47.1(c), first sentence)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

HATTA, Mikio
Dia Palace Nibancho
11-9, Nibancho
Chiyoda-ku
Tokyo 102-0084
JAPON



Date of mailing (day/month/year) 18 January 2001 (18.01.01)		IMPORTANT NOTICE	
Applicant's or agent's file reference F2000-55-PCT			
International application No. PCT/JP00/04595	International filing date (day/month/year) 10 July 2000 (10.07.00)	Priority date (day/month/year) 08 July 1999 (08.07.99)	
Applicant FUJIMORI KOGYO CO., LTD. et al			

1. Notice is hereby given that the International Bureau has communicated, as provided in Article 20, the international application to the following designated Offices on the date indicated above as the date of mailing of this Notice:
AG,AU,BZ,DZ,KP,KR,MZ,US

In accordance with Rule 47.1(c), third sentence, those Offices will accept the present Notice as conclusive evidence that the communication of the international application has duly taken place on the date of mailing indicated above and no copy of the international application is required to be furnished by the applicant to the designated Office(s).

2. The following designated Offices have waived the requirement for such a communication at this time:

AE,AL,AM,AP,AT,AZ,BA,BB,BG,BR,BY,CA,CH,CN,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,EA,EE,EP,ES,FI,GB,GD,
GE,GH,GM,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KZ,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LV,MA,MD,MG,MK,MN,MW,MX,
NO,NZ,OA,PL,PT,RO,RU,SD,SE,SG,SI,SK,SL,TJ,TM,TR,TT,TZ,UA,UG,UZ,VN,YU,ZA,ZW

The communication will be made to those Offices only upon their request. Furthermore, those Offices do not require the applicant to furnish a copy of the international application (Rule 49.1(a-bis)).

3. Enclosed with this Notice is a copy of the international application as published by the International Bureau on
18 January 2001 (18.01.01) under No. WO 01/03740

REMINDER REGARDING CHAPTER II (Article 31(2)(a) and Rule 54.2)

If the applicant wishes to postpone entry into the national phase until 30 months (or later in some Offices) from the priority date, a demand for international preliminary examination must be filed with the competent International Preliminary Examining Authority before the expiration of 19 months from the priority date.

It is the applicant's sole responsibility to monitor the 19-month time limit.

Note that only an applicant who is a national or resident of a PCT Contracting State which is bound by Chapter II has the right to file a demand for international preliminary examination.

REMINDER REGARDING ENTRY INTO THE NATIONAL PHASE (Article 22 or 39(1))

If the applicant wishes to proceed with the international application in the national phase, he must, within 20 months or 30 months, or later in some Offices, perform the acts referred to therein before each designated or elected Office.

For further important information on the time limits and acts to be performed for entering the national phase, see the Annex to Form PCT/IB/301 (Notification of Receipt of Record Copy) and Volume II of the PCT Applicant's Guide.

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland Facsimile No. (41-22) 740.14.35	Authorized officer J. Zahra Telephone No. (41-22) 338.83.38
--	---

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

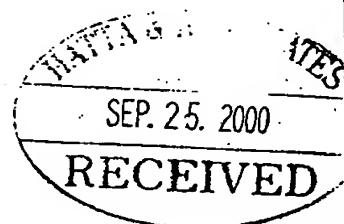
NOTIFICATION CONCERNING
SUBMISSION OR TRANSMITTAL
OF PRIORITY DOCUMENT

(PCT Administrative Instructions, Section 411)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

HATTA, Mikio
Dia Palace Nibancho
11-9, Nibancho
Chiyoda-ku
Tokyo 102-0084
JAPON



Date of mailing (day/month/year) 13 September 2000 (13.09.00)	IMPORTANT NOTIFICATION
Applicant's or agent's file reference F2000-55-PCT	
International application No. PCT/JP00/04595	
International publication date (day/month/year) Not yet published	
Applicant FUJIMORI KOGYO CO., LTD. et al	International filing date (day/month/year) 10 July 2000 (10.07.00) Priority date (day/month/year) 08 July 1999 (08.07.99)

- The applicant is hereby notified of the date of receipt (except where the letters "NR" appear in the right-hand column) by the International Bureau of the priority document(s) relating to the earlier application(s) indicated below. Unless otherwise indicated by an asterisk appearing next to a date of receipt, or by the letters "NR", in the right-hand column, the priority document concerned was submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a) or (b).
- This updates and replaces any previously issued notification concerning submission or transmittal of priority documents.
- An asterisk(*) appearing next to a date of receipt, in the right-hand column, denotes a priority document submitted or transmitted to the International Bureau but not in compliance with Rule 17.1(a) or (b). In such a case, the attention of the applicant is directed to Rule 17.1(c) which provides that no designated Office may disregard the priority claim concerned before giving the applicant an opportunity, upon entry into the national phase, to furnish the priority document within a time limit which is reasonable under the circumstances.
- The letters "NR" appearing in the right-hand column denote a priority document which was not received by the International Bureau or which the applicant did not request the receiving Office to prepare and transmit to the International Bureau, as provided by Rule 17.1(a) or (b), respectively. In such a case, the attention of the applicant is directed to Rule 17.1(c) which provides that no designated Office may disregard the priority claim concerned before giving the applicant an opportunity, upon entry into the national phase, to furnish the priority document within a time limit which is reasonable under the circumstances.

<u>Priority date</u>	<u>Priority application No.</u>	<u>Country or regional Office or PCT receiving Office</u>	<u>Date of receipt of priority document</u>
08 July 1999 (08.07.99)	11/194622	JP	25 Augu 2000 (25.08.00)
02 Febr 2000 (02.02.00)	2000/25341	JP	25 Augu 2000 (25.08.00)
10 Febr 2000 (10.02.00)	2000/34169	JP	25 Augu 2000 (25.08.00)

The International Bureau of WIPO
34, chemin des Colombettes
1211 Geneva 20, Switzerland

Facsimile No. (41-22) 740.14.35

Authorized officer

Sean Taylor

SAS

Telephone No. (41-22) 338.83.38

PCT REQUEST

F 2000-55-PCT

0	For receiving Office use only	
0-1	International Application No.	
0-2	International Filing Date	
0-3	Name of receiving Office and *PCT International Application*	
0-4	Form-PCT/RO/101 PCT Request	
0-4-1	Prepared using	PCT-EASY Version 2.90 (updated 10.05.2000)
0-5	Petition The undersigned requests that the present international application be processed according to the Patent Cooperation Treaty	
0-6	Receiving Office (specified by the applicant)	Japanese Patent Office (RO/JP)
0-7	Applicant's or agent's file reference	F 2000-55-PCT
I	Title of Invention	SERINE PROTEASE INHIBITOR
II	Applicant	
II-1	This person is:	applicant only
II-2	Applicant for	all designated States except US
II-4	Name	FUJIMORI KOGYO CO., LTD.
II-5	Address:	4-16, Nihonbashibakurocho 1-chome, Chuo-ku, Tokyo 103-0002 Japan
II-6	State of nationality	JP
II-7	State of residence	JP
III-1	Applicant and/or inventor	
III-1-1	This person is:	applicant and inventor
III-1-2	Applicant for	US only
III-1-4	Name (LAST, First)	SHIMA, Midori
III-1-5	Address:	c/o NARA MEDICAL UNIVERSITY, 840, Shijocho, Kashihara City, Nara 634-0813 Japan
III-1-6	State of nationality	JP
III-1-7	State of residence	JP

PCT REQUEST

F 2000-55-PCT

III-2	Applicant and/or Inventor	applicant and inventor US only KOIDE, Takehiko c/o HIMEJI INSTITUTE OF TECHNOLOGY, 3-2-1, Kouto, Kamigoricho, Ako-gun, Hyogo 678-1297 Japan JP JP
III-2-1	This person is:	
III-2-2	Applicant for	
III-2-4	Name (LAST, First)	
III-2-5	Address:	
III-2-6	State of nationality	
III-2-7	State of residence	applicant and inventor US only HOSOKAWA, Kazuya 1547-1, Kamimarukosannoucho, Nakahara-ku, Kawasaki-shi, Kanagawa 211-0002 Japan JP JP
III-3	Applicant and/or Inventor	
III-3-1	This person is:	
III-3-2	Applicant for	
III-3-4	Name (LAST, First)	
III-3-5	Address:	
III-3-6	State of nationality	
III-3-7	State of residence	applicant and inventor US only SUZUKI, Toyoaki 4-2-24, Nishiichinoe, Edogawa-ku, Tokyo 132-0023 Japan JP JP
III-4	Applicant and/or Inventor	
III-4-1	This person is:	
III-4-2	Applicant for	
III-4-4	Name (LAST, First)	
III-4-5	Address:	
III-4-6	State of nationality	
III-4-7	State of residence	

PCT REQUEST

F 2000-55-PCT

III-5	Applicant and/or inventor	applicant and inventor
III-5-1	This person is:	US only
III-5-2	Applicant for	NAGATA, Masanori
III-5-4	Name (LAST, First)	3-16-40, Nishiohi, Shinagawa-ku,
III-5-5	Address:	Tokyo 140-0015 Japan
III-5-6	State of nationality	JP
III-5-7	State of residence	JP
IV-1	Agent or common representative; or address for correspondence The person identified below is hereby/has been appointed to act on behalf of the applicant(s) before the competent International Authorities as:	agent
IV-1-1	Name (LAST, First)	HATTA, Mikio
IV-1-2	Address:	Dia Palace Nibancho, 11-9, Nibancho, Chiyoda-ku, Tokyo 102-0084 Japan
IV-1-3	Telephone No.	03-3230-4766
IV-1-4	Facsimile No.	03-3263-4668
IV-1-5	e-mail	hatta@ma.kcom.ne.jp
IV-2	Additional agent(s)	additional agent(s) with same address as first named agent
IV-2-1	Name(s)	NOGAMI, Atsushi; NARA, Yasuo; SAITOH, Etsuko; UTANI, Katsuyuki
V	Designation of States	
V-1	Regional Patent (other kinds of protection or treatment, if any, are specified between parentheses after the designation(s) concerned)	<p>AP: GH GM KE LS MW MZ SD SL SZ TZ UG ZW and any other State which is a Contracting State of the Harare Protocol and of the PCT</p> <p>EA: AM AZ BY KG KZ MD RU TJ TM and any other State which is a Contracting State of the Eurasian Patent Convention and of the PCT</p> <p>EP: AT BE CH&LI CY DE DK ES FI FR GB GR IE IT LU MC NL PT SE and any other State which is a Contracting State of the European Patent Convention and of the PCT</p> <p>OA: BF BJ CF CG CI CM GA GN GW ML MR NE SN TD TG and any other State which is a member State of OAPI and a Contracting State of the PCT</p>

PCT REQUEST

F 2000-55-PCT

V-2	National Patent (Other kinds of protection or treatment, if any, are specified between parentheses after the designation(s) concerned)	AE AG AL AM AT AU AZ BA BB BG BR BY BZ CA CH&LI CN CR CU CZ DE DK DM DZ EE ES FI GB GD GE GH GM HR HU ID IL IN IS JP KE KG KP KR KZ LC LK LR LS LT LU LV MA MD MG MK MN MW MX MZ NO NZ PL PT RO RU SD SE SG SI SK SL TJ TM TR TT TZ UA UG US UZ VN YU ZA ZW	
V-5	Precautionary Designation Statement In addition to the designations made under items V-1, V-2 and V-3, the applicant also makes under Rule 4.9(b) all designations which would be permitted under the PCT except any designation(s) of the State(s) indicated under item V-6 below. The applicant declares that those additional designations are subject to confirmation and that any designation which is not confirmed before the expiration of 15 months from the priority date is to be regarded as withdrawn by the applicant at the expiration of that time limit.		
V-6	Exclusion(s) from precautionary designations	NONE	
VI-1 VI-1-1 VI-1-2 VI-1-3	Priority claim of earlier national application Filing date Number Country	8 July 1999 (08.07.1999) Patent Application 11-194622 JP	
VI-2 VI-2-1 VI-2-2 VI-2-3	Priority claim of earlier national application Filing date Number Country	02 February 2000 (02.02.2000) Patent Application 2000-025341 JP	
VI-3 VI-3-1 VI-3-2 VI-3-3	Priority claim of earlier national application Filing date Number Country	10 February 2000 (10.02.2000) Patent Application 2000-034169 JP	
VI-4	Priority document request The receiving Office is requested to prepare and transmit to the International Bureau a certified copy of the earlier application(s) identified above as item(s):	VI-1, VI-2, VI-3	
VII-1	International Searching Authority Chosen	Japanese Patent Office (JPO) (ISA/JP)	
VIII	Check list	number of sheets	electronic file(s) attached
VIII-1	Request (including declaration sheets)	5	-
VIII-2	Description	25	-
VIII-3	Claims	2	-
VIII-4	Abstract	1	f2000_55.txt
VIII-5	Drawings	0	-
VIII-7	TOTAL	33	

PCT REQUEST

F 2000-55-PCT

	Accompanying items	paper document(s) attached	electronic file(s) attached
VIII-8	Fee calculation sheet	V	-
VIII-9	Separate signed power of attorney	V	-
VIII-16	PCT-EASY diskette	-	Diskette
VIII-17	Other (specified):	Revenue stamps of transmittal fee and search fee for receiving office	-
VIII-17	Other (specified):	Submission of certificate of payment for international fee	-
VIII-18	Figure of the drawings which should accompany the abstract		
VIII-19	Language of filing of the international application	Japanese	
IX-1	Signature of applicant, agent or common representative		
IX-1-1	Name (LAST, First)	HATTA, Mikio	

FOR RECEIVING OFFICE USE ONLY

10-1	Date of actual receipt of the purported international application	
10-2	Drawings:	
10-2-1	Received	
10-2-2	Not received	
10-3	Corrected date of actual receipt due to later but timely received papers or drawings completing the purported international application	
10-4	Date of timely receipt of the required corrections under PCT Article 11(2)	
10-5	International Searching Authority	ISA/JP
10-6	Transmittal of search copy delayed until search fee is paid	

FOR INTERNATIONAL BUREAU USE ONLY

11-1	Date of receipt of the record copy by the International Bureau	
------	--	--

The demand must be filed directly with the competent International Preliminary Examining Authority or, if two or more Authorities are competent with the one chosen by the applicant. The full name or two-letter code of that Authority may be indicated by the applicant on the line below:

IPEA/ _____

PCT

CHAPTER II

DEMAND

under Article 31 of the Patent Cooperation Treaty:
The undersigned requests that the international application specified below be the subject of international preliminary examination according to the Patent Cooperation Treaty and hereby elects all eligible States (except where otherwise indicated).

For International Preliminary Examining Authority use only		
Identification of IPEA		Date of receipt of DEMAND
Box No. I IDENTIFICATION OF THE INTERNATIONAL APPLICATION		Applicant's or agent's file reference F 2000-55-PCT
International application No. PCT/JP00/04595	International filing date (day/month/year) 10 July 2000 (10.07.00)	(Earliest) Priority date (day/month/year) 08 July 1999 (08.07.99)
Title of invention SERINE PROTEASE INHIBITOR		
Box No. II APPLICANT(S)		
Name and address: (Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country.) FUJIMORI KOGYO CO., LTD. 4-16, Nihonbashibakurocho 1-chome, Chuo-ku, Tokyo 103-0002 Japan		Telephone No.: Facsimile No.: Teleprinter No.:
State (that is, country) of nationality: JAPAN		State (that is, country) of residence: JAPAN
Name and address: (Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country.) CHISSO CORPORATION 6-32, Nakanoshima 3-chome, Kita-ku, Osaka-shi, Osaka 530-0005 Japan		
State (that is, country) of nationality: JAPAN		State (that is, country) of residence: JAPAN
Name and address: (Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country.) SHIMA, Midori c/o NARA MEDICAL UNIVERSITY, 840, Shijocho, Kashihara City, Nara 634-0813 Japan		
State (that is, country) of nationality: JAPAN		State (that is, country) of residence: JAPAN
<input checked="" type="checkbox"/> Further applicants are indicated on a continuation sheet.		

Continuation of Box No. II APPLICANT(S)

If none of the following sub-boxes is used, this sheet should not be included in the demand

Name and address: (Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country.)

KOIDE, Takehiko

c/o HIMEJI INSTITUTE OF TECHNOLOGY,
3-2-1, Kouto, Kamigoricho, Ako-gun,
Hyogo 678-1297 Japan

State (that is, country) of nationality: JAPAN

State (that is, country) of residence: JAPAN

Name and address: (Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country.)

HOSOKAWA, Kazuya

1547-1, Kamimarukosannouchi, Nakahara-ku,
Kawasaki-shi, Kanagawa 211-0002 Japan

State (that is, country) of nationality: JAPAN

State (that is, country) of residence: JAPAN

Name and address: (Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country.)

SUZUKI, Toyoaki

4-2-24, Nishiichinoe, Edogawa-ku,
Tokyo 132-0023 Japan

State (that is, country) of nationality: JAPAN

State (that is, country) of residence: JAPAN

Name and address: (Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country.)

NAGATA, Masanori

3-16-40, Nishiohi, Shinagawa-ku,
Tokyo 140-0015 Japan

State (that is, country) of nationality: JAPAN

State (that is, country) of residence: JAPAN

☐ Further applicants are indicated on another continuation sheet.

Box No. III AGENT OR COMMON REPRESENTATIVE; OR ADDRESS FOR CORRESPONDENCEThe following person is ☒ agent ☐ common representativeand ☒ has been appointed earlier and represents the applicant(s) also for international preliminary examination.☐ is hereby appointed and any earlier appointment of (an) agent(s)/common representative is hereby revoked.☐ is hereby appointed, specifically for the procedure before the International Preliminary Examining Authority, in addition to the agent(s)/common representative appointed earlier.Name and address: *(Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation.
The address must include postal code and name of country.)*

7234 Patent Attorney HATTA, Mikio

Dia Palace Nibancho, 11-9,
Nibancho, Chiyoda-ku, Tokyo 102-0084 Japan

Telephone No.:

03-3230-4766

Facsimile No.:

03-3263-4668

Teleprinter No.:

☐ **Address for correspondence:** Mark this check-box where no agent or common representative is/has been appointed and the space above is used instead to indicate a special address to which correspondence should be sent.**Box No. IV BASIS FOR INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION****Statement concerning amendments:***

1. The applicant wishes the international preliminary examination to start on the basis of:

☒ the international application as originally filedthe description ☐ as originally filed☐ as amended under Article 34the claims ☐ as originally filed☐ as amended under Article 19 (together with any accompanying statement)☐ as amended under Article 34the drawings ☐ as originally filed☐ as amended under Article 342. ☐ The applicant wishes any amendment to the claims under Article 19 to be considered as reversed.3. ☐ The applicant wishes the start of the international preliminary examination to be postponed until the expiration of 20 months from the priority date unless the International Preliminary Examining Authority receives a copy of any amendments made under Article 19 or a notice from the applicant that he does not wish to make such amendments (Rule 69.1(d)). *(This check-box may be marked only where the time limit under Article 19 has not yet expired.)*

* Where no check-box is marked, international preliminary examination will start on the basis of the international application as originally filed or, where a copy of amendments to the claims under Article 19 and/or amendments of the international application under Article 34 are received by the International Preliminary Examining Authority before it has begun to draw up a written opinion or the international preliminary examination report, as so amended.

Language for the purposes of international preliminary examination: Japanese☒ which is the language in which the international application was filed.☐ which is the language of a translation furnished for the purposes of international search.☐ which is the language of publication of the international application.☐ which is the language of the translation (to be) furnished for the purposes of international preliminary examination.**Box No. V ELECTION OF STATES**The applicant hereby elects all eligible States *(that is, all States which have been designated and which are bound by Chapter II of the PCT)*

excluding the following States which the applicant wishes not to elect:

Box No. VI CHECK LIST

The demand is accompanied by the following elements, in the language referred to in Box No. IV, for the purposes of international preliminary examination:

- | | | |
|--|---|--------|
| 1. translation of international application | : | sheets |
| 2. amendments under Article 34 | : | sheets |
| 3. copy (or, where required, translation) of amendments under Article 19 | : | sheets |
| 4. copy (or, where required, translation) of statement under Article 19 | : | sheets |
| 5. letter | : | sheets |
| 6. other (specify) | : | sheets |

For International Preliminary Examining Authority use only

received not received

<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

The demand is also accompanied by the item(s) marked below:

- | | |
|--|---|
| 1. <input checked="" type="checkbox"/> fee calculation sheet | 4. <input type="checkbox"/> statement explaining lack of signature. |
| 2. <input type="checkbox"/> separate signed power of attorney | 5. <input type="checkbox"/> nucleotide and or amino acid sequence listing in computer readable form |
| 3. <input type="checkbox"/> copy of general power of attorney; reference number, if any: | 6. <input type="checkbox"/> other (specify): |

Box No. VII SIGNATURE OF APPLICANT, AGENT OR COMMON REPRESENTATIVE

Next to each signature, indicate the name of the person signing and the capacity in which the person signs (if such capacity is not obvious from reading the demand).

HATTA, Mikio (seal)

For International Preliminary Examining Authority use only

1. Date of actual receipt of DEMAND:

2. Adjusted date of receipt of demand due to CORRECTIONS under Rule 60.1(b):

3. ☐ The date of receipt of the demand is AFTER the expiration of 19 months from the priority date and item 4 or 5, below, does not apply. ☐ The applicant has been informed accordingly.

4. ☐ The date of receipt of the demand is WITHIN the period of 19 months from the priority date as extended by virtue of Rule 80.5.

5. ☐ Although the date of receipt of the demand is after the expiration of 19 months from the priority date, the delay in arrival is EXCUSED pursuant to Rule 82.

For International Bureau use only

Demand received from IPEA on:

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

NOTIFICATION OF RECEIPT OF
RECORD COPY

(PCT Rule 24.2(a))

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

HATTA, Mikio
Dia Palace Nibancho
11-9, Nibancho
Chiyoda-ku
Tokyo 102-0084
JAPON

Date of mailing (day/month/year) 14 August 2000 (14.08.00)	IMPORTANT NOTIFICATION
Applicant's or agent's file reference F2000-55-PCT	International application No. PCT/JP00/04595

The applicant is hereby notified that the International Bureau has received the record copy of the international application as detailed below.

Name(s) of the applicant(s) and State(s) for which they are applicants:

FUJIMORI KOGYO CO., LTD. (for all designated States except US)

SHIMA, Midori et al (for US)

International filing date : 10 July 2000 (10.07.00)
Priority date(s) claimed : 08 July 1999 (08.07.99)
02 February 2000 (02.02.00)
10 February 2000 (10.02.00)

Date of receipt of the record copy
by the International Bureau : 21 July 2000 (21.07.00)

List of designated Offices :

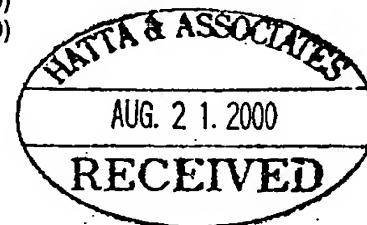
AP : GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW

EA : AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM

EP : AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE

OA : BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG

National : AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EE,
ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA,
MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US,
UZ, VN, YU, ZA, ZW



The International Bureau of WIPO
34, chemin des Colombettes
1211 Geneva 20, Switzerland

Facsimile No. (41-22) 740.14.35

Authorized officer:

Susumu Kubo

Telephone No. (41-22) 338.83.38

Continuation of Form PCT/IB/301

NOTIFICATION OF RECEIPT OF RECORD COPY

Date of mailing (day/month/year) 14 August 2000 (14.08.00)	IMPORTANT NOTIFICATION
Applicant's or agent's file reference F2000-55-PCT	International application No. PCT/JP00/04595

ATTENTION

The applicant should carefully check the data appearing in this Notification. In case of any discrepancy between these data and the indications in the international application, the applicant should immediately inform the International Bureau.

In addition, the applicant's attention is drawn to the information contained in the Annex, relating to:

- ☒ time limits for entry into the national phase
- ☐ confirmation of precautionary designations
- ☒ requirements regarding priority documents

A copy of this Notification is being sent to the receiving Office and to the International Searching Authority.

INFORMATION ON TIME LIMITS FOR ENTERING THE NATIONAL PHASE

The applicant is reminded that the "national phase" must be entered before each of the designated Offices indicated in the Notification of Receipt of Record Copy (Form PCT/IB/301) by paying national fees and furnishing translations, as prescribed by the applicable national laws.

The time limit for performing these procedural acts is **20 MONTHS** from the priority date or, for those designated States which the applicant elects in a demand for international preliminary examination or in a later election, **30 MONTHS** from the priority date, provided that the election is made before the expiration of 19 months from the priority date. Some designated (or elected) Offices have fixed time limits which expire even later than 20 or 30 months from the priority date. In other Offices an extension of time or grace period, in some cases upon payment of an additional fee, is available.

In addition to these procedural acts, the applicant may also have to comply with other special requirements applicable in certain Offices. It is the applicant's responsibility to ensure that the necessary steps to enter the national phase are taken in a timely fashion. Most designated Offices do not issue reminders to applicants in connection with the entry into the national phase.

For detailed information about the procedural acts to be performed to enter the national phase before each designated Office, the applicable time limits and possible extensions of time or grace periods, and any other requirements, see the relevant Chapters of Volume II of the PCT Applicant's Guide. Information about the requirements for filing a demand for international preliminary examination is set out in Chapter IX of Volume I of the PCT Applicant's Guide.

GR and ES became bound by PCT Chapter II on 7 September 1996 and 6 September 1997, respectively, and may, therefore, be elected in a demand or a later election filed on or after 7 September 1996 and 6 September 1997, respectively, regardless of the filing date of the international application. (See second paragraph above.)

Note that only an applicant who is a national or resident of a PCT Contracting State which is bound by Chapter II has the right to file a demand for international preliminary examination.

CONFIRMATION OF PRECAUTIONARY DESIGNATIONS

This notification lists only specific designations made under Rule 4.9(a) in the request. It is important to check that these designations are correct. Errors in designations can be corrected where precautionary designations have been made under Rule 4.9(b). The applicant is hereby reminded that any precautionary designations may be confirmed according to Rule 4.9(c) before the expiration of 15 months from the priority date. If it is not confirmed, it will automatically be regarded as withdrawn by the applicant. There will be no reminder and no invitation. Confirmation of a designation consists of the filing of a notice specifying the designated State concerned (with an indication of the kind of protection or treatment desired) and the payment of the designation and confirmation fees. Confirmation must reach the receiving Office within the 15-month time limit.

REQUIREMENTS REGARDING PRIORITY DOCUMENTS

For applicants who have not yet complied with the requirements regarding priority documents, the following is recalled.

Where the priority of an earlier national, regional or international application is claimed, the applicant must submit a copy of the said earlier application, certified by the authority with which it was filed ("the priority document") to the receiving Office (which will transmit it to the International Bureau) or directly to the International Bureau, before the expiration of 16 months from the priority date, provided that any such priority document may still be submitted to the International Bureau before that date of international publication of the international application, in which case that document will be considered to have been received by the International Bureau on the last day of the 16-month time limit (Rule 17.1(a)).

Where the priority document is issued by the receiving Office, the applicant may, instead of submitting the priority document, request the receiving Office to prepare and transmit the priority document to the International Bureau. Such request must be made before the expiration of the 16-month time limit and may be subjected by the receiving Office to the payment of a fee (Rule 17.1(b)).

If the priority document concerned is not submitted to the International Bureau or if the request to the receiving Office to prepare and transmit the priority document has not been made (and the corresponding fee, if any, paid) within the applicable time limit indicated under the preceding paragraphs, any designated State may disregard the priority claim, provided that no designated Office may disregard the priority claim concerned before giving the applicant an opportunity to furnish the priority document within a time limit which is reasonable under the circumstances.

Where several priorities are claimed, the priority date to be considered for the purposes of computing the 16-month time limit is the filing date of the earliest application whose priority is claimed.

PATENT COOPERATION TREATY

RECEIVED

From the
INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINING AUTHORITY

APR 29 2002

PCT

TECH CENTER 1600/2900

To:

Mr. Mikio Hatta

Dia Palace Nibancho, 11-9, Nibancho,
Chiyoda-ku, Tokyo 102-0084

WRITTEN OPINION

(PCT Rule 66)

Applicant's or agent's file reference F 2000-55-PCT		Date of mailing (day/month/year) 13.02.01 (February 13, 2001))
International application No. PCT/JP00/04595	International filing date (day/month/year) 10.07.00 (July 10, 2000)	Priority date (day/month/year) 08.07.99 (July 8, 1999)
International Patent Classification (IPC) or both national classification and IPC Int.Cl ⁷ A61K45/00, 38/36, A61P7/02, 7/04, 1/00, 43/00		
Applicant FUJIMORI KOGYO CO., LTD.		

1. This written opinion is the first (first, etc.) drawn by this International Preliminary Examining Authority.
2. This opinion contains indications relating to the following items:
 - I ☒ Basis of the report
 - II ☐ Priority
 - III ☐ Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability
 - IV ☐ Lack of unity of invention
 - V ☒ Reasoned statement under Rule 66.2(a)(ii) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement
 - VI ☐ Certain documents cited
 - VII ☐ Certain defects in the international application
 - VIII ☒ Certain observations on the international application
3. The applicant is hereby invited to reply to this opinion.

When? See the time limit indicated above. The applicant may, before the expiration of that time limit, request this Authority to grant an extension, see Rule 66.2(d).

How? By submitting a written reply, accompanied, where appropriate, by amendments, according to Rule 66.3. For the form and the language of the amendments, see Rules 66.8 and 66.9.

Also For an additional opportunity to submit amendments, see Rule 66.4.
For the examiner's obligation to consider amendments and/or arguments, see Rule 66.4bis.
For an informal communication with the examiner, see Rule 66.6.

If no reply is filed, the international preliminary examination report will be established on the basis of this opinion.
4. The final date by which the international preliminary examination report must be established according to Rule 69.2 is: 08.11.01 (November 8, 2001)

Name and mailing address of the IPEA/ JP 4-3, Kasumigaseki 3-chome, Chiyoda-ku, Tokyo 100-8915	Authorized officer Yutaka Shinryu (4C 9639)
Facsimile No. Form PCT/IPEA/408 (cover sheet) (1998)	Telephone No. 03-3581-1101 (3452)

WRITTEN OPINION

International application No.

PCT/JP00/04595

I. Basis of the opinion

1. With regard to the elements of the international application:*

☒ the international application as originally filed

☐ the description:

pages _____, as originally filed

pages _____, filed with the demand

pages _____, filed with the letter of _____

☐ the claims:

pages _____, as originally filed

pages _____, as amended (together with any statement) under article 19

pages _____, filed with the demand

pages _____, filed with the letter of _____

☐ the drawings:

pages _____, as originally filed

pages _____, filed with the demand

pages _____, filed with the letter of _____

☐ the sequence listing part of the description:

pages _____, as originally filed

pages _____, filed with the demand

pages _____, filed with the letter of _____

2. With regard to the language, all the elements marked above were available or furnished to this Authority in the language in which the international application was filed, unless otherwise indicated under this item.

These elements were available or furnished to this Authority in the following language _____ which is:

☐ the language of a translation furnished for the purposes of international search (under Rule 23.1(b)).

☐ the language of publication of the international application (under Rule 48.3(b)).

☐ the language of the translation furnished for the purposes of international preliminary examination (under Rules 55.2 and/or 55.3).

3. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the written opinion was drawn on the basis of the sequence listing:

☐ contained in the international application in printed form.

☐ filed together with the international application in computer readable form.

☐ furnished subsequently to this Authority in written form.

☐ furnished subsequently to this Authority in computer readable form.

☐ The statement that the subsequently furnished written sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed has been furnished.

☐ The statement that the information recorded in computer readable form is identical to the written sequence listing has been furnished.

4. ☐ The amendments have resulted in the cancellation of:

☐ the description, pages _____

☐ the claims, Nos. _____

☐ the drawings, sheet/fig _____

5. ☐ This opinion has been drawn as if (some of) the amendments had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed, as indicated in the Supplemental Box (Rule 70.2 (c)).

* Replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this opinion as "originally filed".

WRITTEN OPINION

International application No.

PCT/JP00/04595

V. Reasoned statement under Rule 66.2(a)(ii) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

1. Statement

Novelty (N)	Claims	3, 7 - 13	YES
	Claims	1, 2, 4 - 6	NO
Inventive step (IS)	Claims		YES
	Claims	1 - 13	NO
Industrial applicability (IA)	Claims	1 - 13	YES
	Claims		NO

2. Citations and explanations

- (1) Suidan, Hana S., et al., "The serine protease granzyme A does not induce platelet aggregation but inhibits responses triggered by thrombin" Biochem. J., 1996, Vol.315, No.3, p.939-945
- (2) Olson, Steven T., et al., "Role of the catalytic serine in the interaction of serine proteinases with protein inhibitors of the serpin family. Contribution of a covalent interaction to the binding energy of serpin-proteinase complex", J. Biol. Chem. 1995, Vol.270, No.50, p.30007-17
- (3) Hrmon J.T. and Jamieson G.A., "Activation of platelets by alpha-thrombin is a receptor-mediated event. D-phenylalanyl-L-propyl-L-arginine chloromethyl ketone-thrombin, but not N alpha-tosyl-L-lysine chloromethyl ketone-thrombin, binds to the high affinity thrombin receptor", J. Biol. Chem., 1986, Vol.261, No.34, p.15928-33
- (4) Ashton R.W. and Scheraga H.A., "Preparation and characterization of anhydrothrombin", Biochemistry, 1995, Vol.34, No.19, p.6454-63
- (5) Tomono, T., "Preparation of anhydrothrombin and its interaction with plasma antithrombin III", Nippon Ketsueki Gakkai Zasshi (Acta Haematologica Japonica), 1986, Vol.49, No.4, p.969-79
- (6) EP, 882789, A2 (Fujimori Kogyo Co., Ltd.), 09 December, 1998, Full text
- (7) Pei G. et al., "Expression, isolation, and characterization of an active site (serine 528----alanine)mutant of recombinant bovine prothrombin", J. Biol. Chem., 1991, Vol.266, No.15, p.9598-9640

VIII. Certain observations on the international application

The opinions about the clarity of the scope of claim for patent, the specification, and the drawing or about the sufficiency of substantiation of the scope of claim for patent by the specification will be given below.

1. Claims 1 - 3 in the scope of claim for patent: These claims recite absolutely no concrete case of producing serine protease having an amino acid thereof substituted, added, or depleted by the gene manipulation and fail to substantiate (1) the fact that the manipulation is practicable in all the serine protease and (2) the fact that the serine protease mutants produced by the manipulation manifest the same repressing effect as the serine proteases which have undergone a chemical operation.

2. Claims 1, 2, and 4 - 13 in the scope of claim for patent: It is doubtful whether or not the effectiveness of the method of chemical modification recited in the specification of the subject patent application is sufficiently substantiated for all the serine proteases. The reason for this doubt is that the serine proteases have in common the fact that they have a serine residue at their active centers and that since the serine proteases are individually different in the structure of serine protease in the proximity of an active site except the residue mentioned above, the reagent used in the method of operation disclosed in the subject patent application cannot be recognized to be effective in all the cases conceivable.

Further, because the serine residue at the active center contributes to bind a serine protease to the substrate thereof, it does not necessarily follow that a protein devoid of this component is bound to the substrate. The condition for success in this bonding depends on the structure of the active center except the serine residue, and the condition varies from one to another of these serine proteases. From this point of view, the specification is not recognized to substantiate fully the capability of all the serine protease modified proteins to control the original serine proteases.

3. Claims 10 - 13 in the scope of claim for patent: These claims concern inventions which consist in using serine protease inhibitors recited in claims 1 - 9. Expected effects, however, are not accomplished unless specific serine protease inhibitors befitting individual therapeutic purposes are used. For example, the act of preparing an antithrombic agent by using an agent for inhibiting a digestive enzyme contradicts the common technical knowledge. Thus, the descriptions of the relevant claims in the scope of claim for patent lack technical accuracy or sufficient substantiation.

Extra sheet

Continuation of Box V

- (8) Nikkei Bio Tech ed., "Nikkei Bio Saishin Yougo Jiten, the 4th printing", Nikkei BP KK, 1995, page 379, "Serine protease" (See the description stating that serine protease contains a digestive enzyme, and enzymes having blood coagulation and thrombus lytic action.)
- (9) Goodman & Gilman's "The Pharmacological Basis of Therapeutics", Ninth Ed., McGraw-Hill, p.1341-1359

Explanation:

The fact that such anhydridized serine proteases as Granzyme A which is a serine protease and anhydrothrombin compete with serine protease for an inhibitor to be bound to a substrate or an active center is disclosed in Cited References 1 - 5.

Thus, Claims 1, 2, and 4 - 6 in the scope of claim for patent lack novelty.

It is described in Cited References 1 and 3 that the coagulation of blood platelets is also repressed because the thrombin is competitively repressed. The fact that the formation of thrombus is consequently repressed, therefore, is universally known.

Further, the fact that in serine proteases such as thrombin, a digestive enzyme or an enzyme such as activated blood coagulation factor VII which possesses the activity of coagulating blood or dissolving thrombus is present and that the effect that inhibiting coagulation of blood is obtained by repressing such enzyme is widely known by persons of ordinary skill in the art (Cited References 8 and 9).

The idea of trying to use an anhydridized serine protease as a serine protease inhibitor in agents for resisting thrombus and in agents for curing disseminated intravascular coagulation, therefore, is a matter self-evident to persons of ordinary skill in the art. Further, the idea of combining several such serine protease inhibitors is such that it is commonly practiced by persons of ordinary skill in the art.

Thus, the inventions recited in claims 9 - 13 in the scope of claim for patent possess no inventive step.

The idea of adopting the method disclosed in Cited Reference 6 which is a similar method for anhydridization to the method of the subject patent application as a technique for modifying the serine residue of the active center of serine protease is self-evident to persons of ordinary skill in the art. Further, since the method resorting to gene manipulation has been well known (Cited Reference 7), the idea of adopting this method is also a matter self-evident to persons of ordinary skill in the art.

Thus, the inventions recited in claims 3, 7, and 8 in the scope of claim for patent are destitute of inventive step.

For the reasons given above, it is concluded that the inventions recited in claims 1 - 13 in the scope of claim for patent possess no inventive step.

The inventions recited in claims 1 - 13 in the scope of claim for patent possess industrial practicability.

特許協力条約

発信人 日本国特許庁 (国際予備審査機関)

出願人代理人

八田 幹雄

殿

あて名

〒 102-0084

東京都千代田区二番町 1 1 番地 9
ダイアパレス二番町

PCT見解書

(法第13条)
[PCT規則66]



発送日
(日.月.年)

13.02.01

出願人又は代理人
の書類記号

F2000-55-PCT

応答期間

上記発送日から 2 月以内

国際出願番号

PCT/JPO0/04595

国際出願日

(日.月.年) 10.07.00

優先日

(日.月.年) 08.07.99

国際特許分類 (IPC) Int. Cl⁷ A61K45/00, 38/36, A61P7/02, 7/04, 1/00, 43/00

出願人 (氏名又は名称)

藤森工業株式会社

1. これは、この国際予備審査機関が作成した 1 回目の見解書である。

2. この見解書は、次の内容を含む。

I ☒ 見解の基礎

II ☐ 優先権

III ☐ 新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての見解の不作成

IV ☐ 発明の単一性の欠如

V ☒ 法第13条 (PCT規則66.2(a)(ii)) に規定する新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての見解、それを裏付けるための文献及び説明

VI ☐ ある種の引用文献

VII ☐ 国際出願の不備

VIII ☒ 国際出願に対する意見

3. 出願人は、この見解書に回答することが求められる。

いつ?

上記応答期間を参照すること。この応答期間に間に合わないときは、出願人は、法第13条 (PCT規則66.2(d)) に規定するとおり、その期間の経過前に国際予備審査機関に期間延長を請求することができる。ただし、期間延長が認められるのは合理的な理由があり、かつスケジュールに余裕がある場合に限られることに注意されたい。

どのように?

法第13条 (PCT規則66.3) の規定に従い、答弁書及び必要な場合には、補正書を提出する。補正書の様式及び言語については、法施行規則第62条 (PCT規則66.8及び66.9) を参照すること。

なお

補正書を提出する追加の機会については、法施行規則第61条の2 (PCT規則66.4) を参照すること。補正書及び/又は答弁書の審査官による考慮については、PCT規則66.4の2を参照すること。審査官との非公式の連絡については、PCT規則66.6を参照すること。

回答がないときは、国際予備審査報告は、この見解書に基づき作成される。

4. 国際予備審査報告作成の最終期限は、PCT規則69.2の規定により 08.11.01 である。

名称及びあて先

日本国特許庁 (IPEA/JP)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

新留 豊

4C

9639

電話番号 03-3581-1101 内線 3452

PATENT COÖPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

(PCT Article 36 and Rule 70)

Applicant's or agent's file reference F 2000-55-PCT	FOR FURTHER ACTION See Notification of Transmittal of International Preliminary Examination Report (Form PCT/IPEA/416)	
International application No. PCT/JP00/04595	International filing date (day/month/year) 10.07.00 (July 10, 2000)	Priority date (day/month/year) 08.07.99 (July 8, 1999)
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC Int. Cl⁷ A61K45/00, 38/36, A61P7/02, 7/04, 1/00, 43/00		
Applicant FUJIMORI KOGYO CO., LTD.		

1.	This international preliminary examination report has been prepared by this International Preliminary Examining Authority and is transmitted to the applicant according to Article 36.
2.	This REPORT consists of a total of <u>5</u> sheets, including this cover sheet. <input type="checkbox"/> This report is also accompanied by ANNEXES, i.e., sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis for this report and/or sheets containing rectifications made before this Authority (see Rule 70.16 and Section 607 of the Administrative Instructions under the PCT). These annexes consist of a total of _____ sheets.
3.	This report contains indications relating to the following items: <ul style="list-style-type: none"> I <input checked="" type="checkbox"/> Basis of the report II <input type="checkbox"/> Priority III <input type="checkbox"/> Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability IV <input type="checkbox"/> Lack of unity of invention V <input checked="" type="checkbox"/> Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement VI <input type="checkbox"/> Certain documents cited VII <input type="checkbox"/> Certain defects in the international application VIII <input checked="" type="checkbox"/> Certain observations on the international application

Date of submission of the demand 23.01.01 (January 23, 2001)	Date of completion of this report 16.10.01 (October 16, 2001)
Name and mailing address of the IPEA/JP Japanese Patent Office 4-3, Kasumigaseki 3-chome, Chiyoda-ku, Tokyo 100-8915 Facsimile No.	Authorized officer Yumiko Yahara (4C 9261) Telephone No. 03-3581-1101 (3451)

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/JP00/04595

I. Basis of the report

1. With regard to the elements of the international application:*

- ☒ the international application as originally filed
- ☐ the description:
 pages _____, as originally filed
 pages _____, filed with the demand
 pages _____, filed with the letter of _____
- ☐ the claims:
 pages _____, as originally filed
 pages _____, as amended (together with any statement under Article 19
 pages _____, filed with the demand
 pages _____, filed with the letter of _____
- ☐ the drawings:
 pages _____, as originally filed
 pages _____, filed with the demand
 pages _____, filed with the letter of _____
- ☐ the sequence listing part of the description:
 pages _____, as originally filed
 pages _____, filed with the demand
 pages _____, filed with the letter of _____

2. With regard to the language, all the elements marked above were available or furnished to this Authority in the language in which the international application was filed, unless otherwise indicated under this item.

These elements were available or furnished to this Authority in the following language _____ which is:

- ☐ the language of a translation furnished for the purposes of international search (under Rule 23.1(b)).
- ☐ the language of publication of the international application (under Rule 48.3(b)).
- ☐ the language of the translation furnished for the purposes of international preliminary examination (under Rule 55.2 and/or 55.3).

3. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international preliminary examination was carried out on the basis of the sequence listing:

- ☐ contained in the international application in written form.
- ☐ filed together with the international application in computer readable form.
- ☐ furnished subsequently to this Authority in written form.
- ☐ furnished subsequently to this Authority in computer readable form.
- ☐ The statement that the subsequently furnished written sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed has been furnished.
- ☐ The statement that the information recorded in computer readable form is identical to the written sequence listing has been furnished.

4. ☐ The amendments have resulted in the cancellation of:

- ☐ the description, pages _____
- ☐ the claims, Nos. _____
- ☐ the drawings, sheets/fig _____

5. ☐ This report has been established as if (some of) the amendments had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed, as indicated in the Supplemental Box (Rule 70.2(c)).**

* Replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to this report since they do not contain amendments (Rule 70.16 and 70.17).

** Any replacement sheet containing such amendments must be referred to under item 1 and annexed to this report.

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/JP00/04595

V. Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

1. Statement

Novelty (N)	Claims	3, 7 - 13	YES
	Claims	1, 2, 4 - 6	NO
Inventive step (IS)	Claims		YES
	Claims	1 - 13	NO
Industrial applicability (IA)	Claims	1 - 13	YES
	Claims		NO

2. Citations and explanations

- (1) Suidan, Hana S., et al., "The serine protease granzyme A does not induce platelet aggregation but inhibits responses triggered by thrombin" *Biochem. J.*, 1996, Vol.315, No.3, p.939-945
- (2) Olson, Steven T., et al., "Role of the catalytic serine in the interaction of serine proteinases with protein inhibitors of the serpin family. Contribution of a covalent interaction to the binding energy of serpin-proteinase complex", *J. Biol. Chem.* 1995, Vol.270, No.50, p.30007-17
- (3) Hrmon J.T. and Jamieson G.A., "Activation of platelets by alpha-thrombin is a receptor-mediated event. D-phenylalanyl-L-propyl-L-arginine chloromethyl ketone-thrombin, but not N alpha-tosyl-L-lysine chloromethyl ketone-thrombin, binds to the high affinity thrombin receptor", *J. Biol. Chem.*, 1986, Vol.261, No.34, p.15928-33
- (4) Ashton R.W. and Scheraga H.A., "Preparation and characterization of anhydrothrombin", *Biochemistry*, 1995, Vol.34, No.19, p.6454-63
- (5) Tomono, T., "Preparation of anhydrothrombin and its interaction with plasma antithrombin III", *Nippon Ketsueki Gakkai Zasshi (Acta Haematologica Japonica)*, 1986, Vol.49, No.4, p.969-79
- (6) EP, 882789, A2 (Fujimori Kogyo Co., Ltd.), 09 December, 1998, Full text
- (7) Pei G. et al., "Expression, isolation, and characterization of an active site (serine 528----alanine)mutant of recombinant bovine prothrombin", *J. Biol. Chem.*, 1991, Vol.266, No.15, p.9598-9640
- (8) Nikkei Bio Saishin Yougo Jiten, the 4th printing", Nikkei BP KK, 1995, page 379, "Serine protease" (See the description stating that serine protease contains a digestive enzyme, and enzymes having blood coagulation and thrombus lytic action.)
- (9) Goodman & Gilman's "The Pharmacological Basis of Therapeutics", Ninth Ed., McGraw-Hill, p.1341-1359

VIII. Certain observations on the international application

The opinions about the clarity of the scope of claim for patent, the specification, and the drawing or about the sufficiency of substantiation of the scope of claim for patent by the specification will be given below.

1. Claims 1 - 3 in the scope of claim for patent: These claims recite absolutely no concrete case of producing serine protease having an amino acid thereof substituted, added, or depleted by the gene manipulation and fail to substantiate (1) the fact that the manipulation is practicable in all the serine protease and (2) the fact that the serine protease mutants produced by the manipulation manifest the same repressing effect as the serine proteases which have undergone a chemical operation.

2. Claims 1, 2, and 4 - 13 in the scope of claim for patent: It is doubtful whether or not the effectiveness of the method of chemical modification recited in the specification of the subject patent application is sufficiently substantiated for all the serine proteases. The reason for this doubt is that the serine proteases have in common the fact that they have a serine residue at their active centers and that since the serine proteases are individually different in the structure of serine protease in the proximity of an active site except the residue mentioned above, the reagent used in the method of operation disclosed in the subject patent application cannot be recognized to be effective in all the cases conceivable.

Further, because the serine residue at the active center contributes to bind a serine protease to the substrate thereof, it does not necessarily follow that a protein devoid of this component is bound to the substrate. The condition for success in this bonding depends on the structure of the active center except the serine residue, and the condition varies from one to another of these serine proteases. From this point of view, the specification is not recognized to substantiate fully the capability of all the serine protease modified proteins to control the original serine proteases.

3. Claims 10 - 13 in the scope of claim for patent: These claims concern inventions which consist in using serine protease inhibitors recited in claims 1 - 9. Expected effects, however, are not accomplished unless specific serine protease inhibitors befitting individual therapeutic purposes are used. For example, the act of preparing an antithrombic agent by using an agent for inhibiting a digestive enzyme contradicts the common technical knowledge. Thus, the descriptions of the relevant claims in the scope of claim for patent lack technical accuracy or sufficient substantiation.

Extra sheet

Continuation of Box V

Explanation:

The fact that such anhydridized serine proteases as Granzyme A which is a serine protease and anhydrothrombin compete with serine protease for an inhibitor to be bound to a substrate or an active center is disclosed in Cited References 1 - 5.

Thus, Claims 1, 2, and 4 - 6 in the scope of claim for patent lack novelty.

It is described in Cited References 1 and 3 that the coagulation of blood platelets is also repressed because the thrombin is competitively repressed. The fact that the formation of thrombus is consequently repressed, therefore, is universally known.

Further, the fact that in serine proteases such as thrombin, a digestive enzyme or an enzyme such as activated blood coagulation factor VII which possesses the activity of coagulating blood or dissolving thrombus is present and that the effect that inhibiting coagulation of blood is obtained by repressing such enzyme is widely known by persons of ordinary skill in the art (Cited References 8 and 9).

The idea of trying to use an anhydridized serine protease as a serine protease inhibitor in agents for resisting thrombus and in agents for curing disseminated intravascular coagulation, therefore, is a matter self-evident to persons of ordinary skill in the art. Further, the idea of combining several such serine protease inhibitors is such that it is commonly practiced by persons of ordinary skill in the art.

Thus, the inventions recited in claims 9 - 13 in the scope of claim for patent possess no inventive step.

The idea of adopting the method disclosed in Cited Reference 6 which is a similar method for anhydridization to the method of the subject patent application as a technique for modifying the serine residue of the active center of serine protease is self-evident to persons of ordinary skill in the art. Further, since the method resorting to gene manipulation has been well known (Cited Reference 7), the idea of adopting this method is also a matter self-evident to persons of ordinary skill in the art.

Thus, the inventions recited in claims 3, 7, and 8 in the scope of claim for patent are destitute of inventive step.

For the reasons given above, it is concluded that the inventions recited in claims 1 - 13 in the scope of claim for patent possess no inventive step.

The inventions recited in claims 1 - 13 in the scope of claim for patent possess industrial practicability.

7.7
Translation

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

10/018, 895

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

(PCT Article 36 and Rule 70)

Applicant's or agent's file reference F2000-55-PCT	FOR FURTHER ACTION See Notification of Transmittal of International Preliminary Examination Report (Form PCT/IPEA/416)	
International application No. PCT/JP00/04595	International filing date (day/month/year) 10 July 2000 (10.07.00)	Priority date (day/month/year) 08 July 1999 (08.07.99)
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC A61K 45/00, 38/36, A61P 7/02, 7/04, 1/00, 43/00		RECEIVED MAY 20 2002
Applicant FUJIMORI KOGYO CO., LTD.		TECH CENTER 1600/2900

1. This international preliminary examination report has been prepared by this International Preliminary Examining Authority and is transmitted to the applicant according to Article 36.

2. This REPORT consists of a total of 7 sheets, including this cover sheet.

☐ This report is also accompanied by ANNEXES, i.e., sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis for this report and/or sheets containing rectifications made before this Authority (see Rule 70.16 and Section 607 of the Administrative Instructions under the PCT).

These annexes consist of a total of _____ sheets.

3. This report contains indications relating to the following items:

- I ☒ Basis of the report
- II ☐ Priority
- III ☐ Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability
- IV ☐ Lack of unity of invention
- V ☒ Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement
- VI ☐ Certain documents cited
- VII ☐ Certain defects in the international application
- VIII ☒ Certain observations on the international application

Date of submission of the demand 23 January 2001 (23.01.01)	Date of completion of this report 16 October 2001 (16.10.2001)
Name and mailing address of the IPEA/JP	Authorized officer
Facsimile No.	Telephone No.

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/JP00/04595

I. Basis of the report

1. With regard to the **elements** of the international application:*

☒ the international application as originally filed

☐ the description:

pages _____, as originally filed
pages _____, filed with the demand
pages _____, filed with the letter of _____

☐ the claims:

pages _____, as originally filed
pages _____, as amended (together with any statement under Article 19
pages _____, filed with the demand
pages _____, filed with the letter of _____

☐ the drawings:

pages _____, as originally filed
pages _____, filed with the demand
pages _____, filed with the letter of _____

☐ the sequence listing part of the description:

pages _____, as originally filed
pages _____, filed with the demand
pages _____, filed with the letter of _____

2. With regard to the **language**, all the elements marked above were available or furnished to this Authority in the language in which the international application was filed, unless otherwise indicated under this item. These elements were available or furnished to this Authority in the following language _____ which is:

☐ the language of a translation furnished for the purposes of international search (under Rule 23.1(b)).

☐ the language of publication of the international application (under Rule 48.3(b)).

☐ the language of the translation furnished for the purposes of international preliminary examination (under Rule 55.2 and/or 55.3).

3. With regard to any **nucleotide and/or amino acid sequence** disclosed in the international application, the international preliminary examination was carried out on the basis of the sequence listing:

☐ contained in the international application in written form.

☐ filed together with the international application in computer readable form.

☐ furnished subsequently to this Authority in written form.

☐ furnished subsequently to this Authority in computer readable form.

☐ The statement that the subsequently furnished written sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed has been furnished.

☐ The statement that the information recorded in computer readable form is identical to the written sequence listing has been furnished.

4. ☐ The amendments have resulted in the cancellation of:

☐ the description, pages _____

☐ the claims, Nos. _____

☐ the drawings, sheets/fig _____

5. ☐ This report has been established as if (some of) the amendments had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed, as indicated in the Supplemental Box (Rule 70.2(c)).**

* Replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to this report since they do not contain amendments (Rule 70.16 and 70.17).

** Any replacement sheet containing such amendments must be referred to under item 1 and annexed to this report.

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.
PCT/JP 00/04595

V. Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

1. Statement

Novelty (N)	Claims	3, 7-13	YES
	Claims	1, 2, 4-6	NO
Inventive step (IS)	Claims		YES
	Claims	1-13	NO
Industrial applicability (IA)	Claims	1-13	YES
	Claims		NO

2. Citations and explanations

Document 1: Hana S. Suidan et al., "The serine protease granzyme A does not induce platelet aggregation but inhibits responses triggered by thrombin", Biochem. J., 1996, Vol. 315, pp. 939-945

Document 2: Steven S. Olson et al., "Role of the catalytic serine in the interactions of serine proteases with protein inhibitors of the serpin family. Contribution of a covalent interaction to the binding energy of serpin-proteinase complexes", J. Biol. Chem., 1995, Vol. 270, No. 50, pp. 30007-15

Document 3: J. T. Harmon, G. A. Jamieson, "Activation of platelets by alpha-thrombin is a receptor-mediated event. D-phenylalanine-L-prolyl-L-arginine chloromethyl ketone-thrombin, but not N alpha-tosyl-L-lysine chloromethyl ketone-thrombin, binds to the high affinity thrombin receptor", J. Biol. Chem., 1986, Vol. 261, No. 34, pp. 15928-33

Document 4: R. W. Ashton, H. A. Scheraga, "Preparation and characterization of anhydrothrombin", Biochemistry, 1995, Vol. 34, No. 19, pp. 6454-63

- Document 5: T. Tomono, "Preparation of anhydrothrombin and its interaction with plasma antithrombin III", Nippon Ketsueki Gakkai Zasshi (Acta Haematological Japonica), 1986, Vol. 49, No. 4, pp. 969-79
- Document 6: EP, 882789, A2 (Fujimori Kogyo Co., Ltd.), 9 December 1998 (09.12.88)
- Document 7: G. Pei et al., "Expression, isolation and characterization of an active site (serine 259-----alanine) mutant of recombinant bovine prothrombin", J. Biol. Chem., 1991, Vol. 266, No. 15, pp. 9598-9604
- Document 8: Nikkei Biotech (editor), "Nikkei Baio Saishin Yougo Jitten. Dai 4 han" [Nikkei Dictionary of Recent Biotechnology Terminology, 4th edition], Nikkei BP, 1995, page 379 "Serin purotease" [Serine protease]
- Document 9: Goodman & Gilman's "The Pharmacological Basis of Therapeutics" 9th Ed., McGraw-Hill, pp. 1341-1359

Explanation:

Documents 1-5 disclose competition as the mechanism of the serine protease granzyme A or serine protease anhydro derivatives such as anhydrothrombin as inhibitors in binding between serine protease and its substrate or binding to the active centre.

Therefore, Claims 1, 2 and 4-6 are not novel.

Documents 1 and 3 disclose suppression of platelet aggregation by competitive inhibition of thrombin, and it is known that this can suppress thrombus production.

It is also well known within the art that serine proteases such as thrombin include digestive enzymes or enzymes such as activated blood clotting factor VII which

have blood clotting or thrombolytic activity, and that an effect such as suppression of blood clotting can be obtained by inhibition thereof (Documents 8 and 9).

Therefore, investigation of anhydro derivatives of serine protease as serine protease inhibitors for applications such as antithrombotics and agents for treating disseminated intravascular coagulation is obvious to a person skilled in the art. Combination of a plurality of these serine proteases is also routine practice in the art.

Therefore the inventions set forth in Claims 9-13 do not involve an inventive step.

Adoption of the procedure disclosed in Document 6, which is the same procedure of anhydro modification as in the present application, as a technique for modifying the serine residue at the active centre of a serine protease is obvious to a person skilled in the art. Moreover, methods for genetic manipulation are also known (Document 7), and adoption thereof is obvious to a person skilled in the art.

Therefore, the inventions set forth in Claims 3, 7 and 8 involve an inventive step.

From the above, the inventions set forth in Claims 1-13 do not involve an inventive step.

The inventions set forth in Claims 1-13 are industrially applicable.

VIII. Certain observations on the international application

The following observations on the clarity of the claims, description, and drawings or on the question whether the claims are fully supported by the description, are made:

1. Claims 1-3: No example is presented of use of gene manipulation to produce serine proteases with amino acid substitution, addition or deletion, and there is no support for (1) the inference that it is possible to use such manipulation for all serine proteases, and (2) the inference that serine protease mutants produced by such manipulation offer the same inhibition as chemically manipulated serine protease.

2. Claims 1, 2 and 4-13: It is questionable whether there is full support for the efficacy of the method for chemical modification indicated in the description for all serine proteases. This is because the only feature in common to serine proteases is the presence of a serine residue at the active site, and the structure around the active site other than said residue(s), is different for each serine protease, and the reagents used in the procedure disclosed in the present application are not effective in every case.

Moreover, the serine residue in the active centre contributes to binding between the serine protease and the substrate thereof; therefore, deletion thereof will inevitably restrict the binding of the protein with its substrate; the conditions for this depend on the structure of the active centre other than said serine residue, which differs between different serine proteases. Given this, the description does not fully support the inference that all modified serine protease proteins can inhibit the initial serine protease.

3. Claims 10-13: These claims relate to inventions using serine protease inhibitors described in Claims 1-9;

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/JP 00/04595

VIII. Certain observations on the international application

however, for each of the respective clinical purposes a specified serine protease inhibitor must be used in order to achieve the desired effect. Use of an inhibitor of a digestive enzyme as an antithrombotic agent, for example, would run counter to ordinary common sense within the art. Therefore, the phrasing of said claims is either technically incorrect or not fully supported.

PCT

国際予備審査報告

(法第12条、法施行規則第56条)
(PCT36条及びPCT規則70)

REC'D 31 OCT 2000
WIPO PCT

MAY 31 2002

RECEIVED

10/018875

出願人又は代理人 の書類記号 F2000-55-PCT	今後の手続きについては、国際予備審査報告の送付通知(様式PCT/IPEA/416)を参照すること。		
国際出願番号 PCT/JP00/04595	国際出願日 (日.月.年) 10.07.00	優先日 (日.月.年) 08.07.99	
国際特許分類(IPC) Int. Cl ⁷ A61K45/00, 38/36, A61P7/02, 7/04, 1/00, 43/00			
出願人(氏名又は名称) 藤森工業株式会社			

- 国際予備審査機関が作成したこの国際予備審査報告を法施行規則第57条(PCT36条)の規定に従い送付する。
- この国際予備審査報告は、この表紙を含めて全部で 5 ページからなる。
☐ この国際予備審査報告には、附属書類、つまり補正されて、この報告の基礎とされた及び/又はこの国際予備審査機関に対してした訂正を含む明細書、請求の範囲及び/又は図面も添付されている。
(PCT規則70.16及びPCT実施細則第607号参照)
この附属書類は、全部で ページである。

- この国際予備審査報告は、次の内容を含む。
 - ☒ 国際予備審査報告の基礎
 - ☐ 優先権
 - ☐ 新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての国際予備審査報告の不作成
 - ☐ 発明の単一性の欠如
 - ☒ PCT35条(2)に規定する新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての見解、それを裏付けるための文献及び説明
 - ☐ ある種の引用文献
 - ☐ 国際出願の不備
 - ☒ 国際出願に対する意見

国際予備審査の請求書を受理した日 23.01.01	国際予備審査報告を作成した日 16.10.01		
名称及びあて先 日本国特許庁(IPEA/JP) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	特許庁審査官(権限のある職員) 八原 由美子	4C	9261
電話番号 03-3581-1101 内線 3451			

I. 国際予備審査報告の基礎

1. この国際予備審査報告は下記の出願書類に基づいて作成された。(法第6条(PCT14条)の規定に基づく命令に
 応答するために提出された差し替え用紙は、この報告書において「出願時」とし、本報告書には添付しない。
 PCT規則70.16, 70.17)

☒ 出願時の国際出願書類

- | | | | |
|-------------------------------------|---------|--------|----------------------|
| <input type="checkbox"/> 明細書 | 第 _____ | ページ、 | 出願時に提出されたもの |
| <input type="checkbox"/> 明細書 | 第 _____ | ページ、 | 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの |
| <input type="checkbox"/> 明細書 | 第 _____ | ページ、 | _____ 付の書簡と共に提出されたもの |
| | | | |
| <input type="checkbox"/> 請求の範囲 | 第 _____ | 項、 | 出願時に提出されたもの |
| <input type="checkbox"/> 請求の範囲 | 第 _____ | 項、 | PCT19条の規定に基づき補正されたもの |
| <input type="checkbox"/> 請求の範囲 | 第 _____ | 項、 | 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの |
| <input type="checkbox"/> 請求の範囲 | 第 _____ | 項、 | _____ 付の書簡と共に提出されたもの |
| | | | |
| <input type="checkbox"/> 図面 | 第 _____ | ページ/図、 | 出願時に提出されたもの |
| <input type="checkbox"/> 図面 | 第 _____ | ページ/図、 | 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの |
| <input type="checkbox"/> 図面 | 第 _____ | ページ/図、 | _____ 付の書簡と共に提出されたもの |
| | | | |
| <input type="checkbox"/> 明細書の配列表の部分 | 第 _____ | ページ、 | 出願時に提出されたもの |
| <input type="checkbox"/> 明細書の配列表の部分 | 第 _____ | ページ、 | 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの |
| <input type="checkbox"/> 明細書の配列表の部分 | 第 _____ | ページ、 | _____ 付の書簡と共に提出されたもの |

2. 上記の出願書類の言語は、下記に示す場合を除くほか、この国際出願の言語である。

上記の書類は、下記の言語である _____ 語である。

- ☐ 国際調査のために提出されたPCT規則23.1(b)にいう翻訳文の言語
☐ PCT規則48.3(b)にいう国際公開の言語
☐ 国際予備審査のために提出されたPCT規則55.2または55.3にいう翻訳文の言語

3. この国際出願は、ヌクレオチド又はアミノ酸配列を含んでおり、次の配列表に基づき国際予備審査報告を行った。

- ☐ この国際出願に含まれる書面による配列表
☐ この国際出願と共に提出されたフレキシブルディスクによる配列表
☐ 出願後に、この国際予備審査(または調査)機関に提出された書面による配列表
☐ 出願後に、この国際予備審査(または調査)機関に提出されたフレキシブルディスクによる配列表
☐ 出願後に提出した書面による配列表が出願時における国際出願の開示の範囲を超える事項を含まない旨の陳述書の提出があった
☐ 書面による配列表に記載した配列とフレキシブルディスクによる配列表に記載した配列が同一である旨の陳述書の提出があった。

4. 補正により、下記の書類が削除された。

- ☐ 明細書 第 _____ ページ
☐ 請求の範囲 第 _____ 項
☐ 図面 図面の第 _____ ページ/図

5. ☐ この国際予備審査報告は、補充欄に示したように、補正が出願時における開示の範囲を越えてされたものと認められるので、その補正がされなかったものとして作成した。(PCT規則70.2(c) この補正を含む差し替え用紙は上記1.における判断の際に考慮しなければならない、本報告に添付する。)

V. 新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての法第12条(PCT35条(2))に定める見解、それを裏付ける文献及び説明

1. 見解

新規性(N)

請求の範囲

3, 7-13

有

請求の範囲

1, 2, 4-6

無

進歩性(IS)

請求の範囲

有

請求の範囲

1-13

無

産業上の利用可能性(IA)

請求の範囲

1-13

有

請求の範囲

無

2. 文献及び説明(PCT規則70.7)

文献1: Suidan, Hana S., et al., 'The serine protease granzyme A does not induce platelet aggregation but inhibits responses triggered by thrombin' Biochem. J., 1996, Vol.315, No.3, p.939-945

文献2: Olson, Steven T., et al., 'Role of the catalytic serine in the interactions of serine proteinases with protein inhibitors of the serpin family. Contribution of a covalent interaction to the binding energy of serpin-proteinase complexes, J. Biol. Chem. 1995, Vol.270, No.50, p.30007-17

文献3: Harmon J.T. and Jamieson G.A., 'Activation of platelets by alpha-thrombin is a receptor-mediated event. D-phenylalanyl-L-prolyl-L-arginine chloromethyl ketone-thrombin, but not N alpha-tosyl-L-lysine chloromethyl ketone-thrombin, binds to the high affinity thrombin receptor' J. Biol. Chem., 1986, Vol.261, No.34, p.15928-33

文献4: Ashton R.W. and Scheraga H.A., 'Preparation and characterization of anhydrothrombin' Biochemistry, 1995, Vol.34, No.19, p.6454-63

文献5: Tomono, T., 'Preparation of anhydrothrombin and its interaction with plasma antithrombin III' Nippon Ketsueki Gakkai Zasshi (Acta Haematologica Japonica), 1986, Vol.49, No.4, p.969-79

文献6: EP, 882789, A2 (Fujimori Kogyo Co., Ltd.), 9.12月.1998 (09.12.98)

文献7: Pei G. et al., 'Expression, isolation, and characterization of an active site (serine 528----alanine) mutant of recombinant bovine prothrombin' J. Biol. Chem., 1991, Vol.266, No.15, p.9598-9604

文献8: 日経バイオテク編, 「日経バイオ最新用語辞典 第四版」, 日経BP社, 1995, 第379頁「セリン・プロテアーゼ」の項

文献9: Goodman & Gilman's 'The Pharmacological Basis of Therapeutics' Ninth Ed., McGraw-Hill, p.1341-1359 (以下、補充欄に続く)

VII. 国際出願に対する意見

請求の範囲、明細書及び図面の明瞭性又は請求の範囲の明細書による十分な裏付についての意見を次に示す。

1. 請求の範囲 1-3: 遺伝子操作によって、セリンプロテアーゼのアミノ酸を置換、付加、欠如したものの製造例が一切記載されず、(1) 全てのセリンプロテアーゼについて当該操作が可能であること、及び(2) 当該操作により製造されたセリンプロテアーゼミュータントが、化学的な操作を受けたセリンプロテアーゼと同様の抑制効果を奏することが、裏付けられていない。

2. 請求の範囲 1, 2, 4-13: 本願明細書に記載の化学的改変方法の有効性に関し、全てのセリンプロテアーゼについて十分な裏付けがあることには疑問がある。なぜなら、セリンプロテアーゼは活性中心にセリン残基がある点でのみ共通するものであり、活性部位周辺の構造は当該残基を除き、各セリンプロテアーゼで異なるため、本願で開示された操作方法に用いられる試薬が、全ての場合において有効であるとは認められないからである。

また、活性中心のセリン残基は、セリンプロテアーゼがその基質に結合する際に寄与するため、これを欠くタンパク質が必ずしも基質と結合するとは限らない。その条件は、当該セリン残基を除く活性中心の構造に依存し、これはそれぞれのセリンプロテアーゼで異なる。この観点から、明細書は全てのセリンプロテアーゼ改変タンパク質につき、元のセリンプロテアーゼを抑制しうるかについて、十分な裏付けがあったとは認められない。

3. 請求の範囲 10-13: これらの請求の範囲は、請求の範囲 1-9 に記載のセリンプロテアーゼ抑制剤を用いる発明に係るが、それぞれの治療目的に応じ、特定のセリンプロテアーゼ抑制剤を用いなければ、所望の効果を達成できない。例えば、消化酵素の抑制剤を用いて抗血栓剤とすることは、通常の技術常識に反する。よって、当該請求の範囲の記載は技術的正確性に欠け、あるいは十分な裏付けがない。

補充欄 (いずれかの欄の大きさが足りない場合に使用すること)

第 V. 欄の続き

説明:

セリンプロテアーゼであるグランザイム A (granzyme A)、あるいはアンヒドロトロンビン等のアンヒドロ化されたセリンプロテアーゼが、セリンプロテアーゼと基質あるいは活性中心に結合する阻害剤について競合することは、文献 1-5 に記載されている。

よって、請求の範囲 1, 2, 4-6 は新規性を有さない。

トロンビンが競合的に抑制される事により、血小板凝集も抑制されることは文献 1, 3 に記載されており、それにより血栓生成が抑制されることは周知である。

またトロンビンなどのセリンプロテアーゼには消化酵素、あるいは活性化血液凝固因子第 V I I 因子等、血液凝固、血栓溶解作用を持つ酵素が存在し、その抑制により血液凝固の抑制等の効果が得られることは当業者に広く知られている (文献 8, 9)。

したがって、アンヒドロ化されたセリンプロテアーゼをセリンプロテアーゼ抑制剤として抗血栓剤、播種性血管内凝固治療剤等に用いてみることは当業者に自明の事項である。また、これらのセリンプロテアーゼ抑制剤を複数組み合わせることも、当業者が通常行う程度のことである。

よって、請求の範囲 9-13 に係る発明は進歩性を有さない。

セリンプロテアーゼの活性中心のセリン残基を改変する技術として、本願と同様のアンヒドロ化の方法である、文献 6 記載の方法を採用することは当業者に自明である。また、遺伝子操作による方法も公知 (文献 7) であるので、こちらを採用することも当業者に自明の事項である。

よって、請求の範囲 3, 7, 8 に係る発明は進歩性を有さない。

以上より、請求の範囲 1-13 に係る発明は進歩性を有さない。

請求の範囲 1-13 に係る発明は産業上の利用可能性を有する。

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

(PCT Article 18 and Rules 43 and 44)

Applicant's or agent's file reference F 2000-55-PCT	FOR FURTHER ACTION	see Notification of Transmittal of International Search Report (Form PCT/ISA/220) as well as, where applicable, item 5 below.
International application No. PCT/JP00/04595	International filing date (day/month/year) 10 July 2000 (10.07.00)	(Earliest) Priority Date (day/month/year) 08 July 1999 (08.07.99)
Applicant FUJIMORI KOGYO CO., LTD.		

This international search report has been prepared by this International Searching Authority and is transmitted to the applicant according to Article 18. A copy is being transmitted to the International Bureau.

This international search report consists of a total of 3 sheets.

☐ It is also accompanied by a copy of each prior art document cited in this report.

1. Basis of the report

a. With regard to the language, the international search was carried out on the basis of the international application in the language in which it was filed, unless otherwise indicated under this item.

☐ the international search was carried out on the basis of a translation of the international application furnished to this Authority (Rule 23.1(b)).

b. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of the sequence listing:

☐ contained in the international application in written form.

☐ filed together with the international application in computer readable form.

☐ furnished subsequently to this Authority in written form.

☐ furnished subsequently to this Authority in computer readable form.

☐ the statement that the subsequently furnished written sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed has been furnished.

☐ the statement that the information recorded in computer readable form is identical to the written sequence listing has been furnished.

2. ☐ Certain claims were found unsearchable (See Box I).

3. ☐ Unity of invention is lacking (See Box II).

4. With regard to the title,

☒ the text is approved as submitted by the applicant.

☐ the text has been established by this Authority to read as follows:

5. With regard to the abstract,

☒ the text is approved as submitted by the applicant.

☐ the text has been established, according to Rule 38.2(b), by this Authority as it appears in Box III. The applicant may, within one month from the date of mailing of this international search report, submit comments to this Authority.

6. The figure of the drawings to be published with the abstract is Figure No. _____

☐ as suggested by the applicant.

☐ because the applicant failed to suggest a figure.

☐ because this figure better characterizes the invention.

☒ None of the figures.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP00/04595

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁷ A61K45/00, 38/36, A61P7/02, 7/04, 1/00, 43/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁷ A61K45/00, 38/36, A61P7/02, 7/04, 1/00, 43/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CAPLUS (STN), BIOSIS (STN), MEDLINE (STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X Y	Suidan, Hana S., et al., 'The serine protease granzyme A does not induce platelet aggregation but inhibits responses triggered by thrombin' Biochem. J., 1996, Vol.315, No.3, p.939-945	1,2,9,10,13 3-8,12
X Y	Olson, Steven T., et al., 'Role of the catalytic serine in the interactions of serine proteinases with protein inhibitors of the serpin family. Contribution of a covalent interaction to the binding energy of serpin-proteinase complexes, J. Biol. Chem. 1995, Vol.270, No.50, p.30007-17	1,2,4-6,9, 10,13 3,7,8,11,12
X Y	Harmon J.T. and Jamieson G.A., 'Activation of platelets by alpha-thrombin is a receptor-mediated event. D-phenylalanyl-L-prolyl-L-arginine chloromethyl ketone-thrombin, but not N alpha-tosyl-L-lysine chloromethyl ketone-thrombin, binds to the high affinity thrombin receptor' J. Biol. Chem., 1986, Vol.261, No.34, p.15928-33	1,2,4-6,9, 10,13 3,7,8,11,12
X Y	Ashton R.W. and Scheraga H.A., 'Preparation and characterization of anhydrothrombin' Biochemistry, 1995,	1,2,4-6 3,7-13

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not

considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"I" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
22 September, 2000 (22.09.00)Date of mailing of the international search report
03 October, 2000 (03.10.00)Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP00/04595

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
	Vol.34, No.19, p.6454-63	
X	Tomono, T., 'Preparation of anhydrotrombin and its interaction with plasma antithrombin III' Nippon Ketsueki Gakkai Zasshi (Acta Haematologica Japonica), 1986, Vol.49, No.4, p.969-79	1,2,4-6 3,7-13
Y	EP, 882789, A2 (Fujimori Kogyo Co., Ltd.), 09 December, 1998 (09.12.98), Full text & JP, 11-049800, A & US, 5939304, A	1,2,4-13
Y	Pei G. et al., 'Expression, isolation, and characterization of an active site (serine 528----alanine) mutant of recombinant bovine prothrombin' J. Biol. Chem., 1991, Vol.266, No.15, p.9598-9604	1-3,9-13
Y	Nikkei Bio Tech ed., "Nikkei Bio Saishin Yougo Jiten, the 4 th printing", Nikkei BP K.K., 1995, page 379, "Serine Protease" (See the description stating that serine protease contains a digestive enzyme, and enzymes having blood coagulation and thrombus lytic action.)	10-13
Y	Goodman & Gilman's 'The Pharmacological Basis of Therapeutics' Ninth Ed., McGraw-Hill, p.1341-1359	10,11,13

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2001 年1月18 日 (18.01.2001)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 01/03740 A1

- (51) 国際特許分類: A61K 45/00, (72) 発明者; および
38/36, A61P 7/02, 7/04, 1/00, 43/00 (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 嶋 緑 倫
(21) 国際出願番号: PCT/JP00/04595 (SHIMA, Midori) [JP/JP]; 〒634-0813 奈良県橿原市
(22) 国際出願日: 2000 年7月10 日 (10.07.2000) 四条町840 奈良県立医科大学内 Nara (JP). 小出武比
(25) 国際出願の言語: 日本語 古 (KOIDE, Takehiko) [JP/JP]; 〒678-1297 兵庫県赤
(26) 国際公開の言語: 日本語 穂郡上郡町光都3-1 姫路工業大学内 Hyogo (JP). 細
(30) 優先権データ: 川和也 (HOSOKAWA, Kazuya) [JP/JP]; 〒211-0002 神
特願平11/194622 1999 年7月8 日 (08.07.1999) JP 奈川県川崎市中原区上丸子山王町1547-1 Kanagawa
特願2000/25341 2000 年2月2 日 (02.02.2000) JP (JP). 鈴木豊明 (SUZUKI, Toyoaki) [JP/JP]; 〒132-0023
特願2000/34169 2000 年2月10 日 (10.02.2000) JP 東京都江戸川区西一之江4-2-24 Tokyo (JP). 永田政令
(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 藤森工 (NAGATA, Masanori) [JP/JP]; 〒140-0015 東京都品川
業株式会社 (FUJIMORI KOGYO CO., LTD.) [JP/JP]; 区西大井3-16-40 Tokyo (JP).
〒103-0002 東京都中央区日本橋馬喰町1丁目4番16号
Tokyo (JP).

(74) 代理人: 八田幹雄, 外 (HATTA, Mikio et al.); 〒102-0084 東京都千代田区二番町11番地9 ダイアパレス二番町 Tokyo (JP).

(81) 指定国 (国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL,

[続葉有]

(54) Title: SERINE PROTEASE INHIBITOR

(54) 発明の名称: セリンプロテアーゼ抑制剤

(57) Abstract: A serine protease inhibitor capable of selectively inhibiting the target serine protease activity alone. This serine protease inhibitor binds to the substrate of serine protease competitively with the serine protease to thereby inhibit the reaction between the serine protease and the substrate. This inhibitor specifically binds to the substrate of the target serine protease to thereby inhibit the activity of the serine protease. This serine protease inhibitor is useful as an antithrombotic agent, a fibrinolysin inhibitor, an anti-digestive enzyme agent and a remedy for disseminated intravascular coagulation.

(57) 要約:

目的とするセリンプロテアーゼの酵素活性のみを選択的に阻害することが可能な、セリンプロテアーゼ抑制剤を提供する。セリンプロテアーゼの基質に、該セリンプロテアーゼと競合して結合することによって、該セリンプロテアーゼと該基質との反応を抑制する物質を含有するセリンプロテアーゼ抑制剤である。該抑制剤は、抑制の対象となるセリンプロテアーゼの基質に対し特異的に結合してセリンプロテアーゼの活性を抑制する。該セリンプロテアーゼ抑制剤は、抗血栓剤、線溶酵素抑制剤、抗消化酵素剤、播種性血管内凝固の治療剤として有用である。

WO 01/03740 A1



IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU,
LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL,
PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ,
UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

LU, MC, NL, PT, SE), OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG, CI,
CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

— 国際調査報告書

(84) 指定国(広域): ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW,
MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), ユーラシア特許 (AM,
AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特許
(AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT,

2文字コード及び他の略語については、定期発行される
各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語
のガイダンスノート」を参照。

明 細 書

セリンプロテアーゼ抑制剤

5 技術分野

本発明は、セリンプロテアーゼと競争してセリンプロテアーゼの基質に結合することによって該セリンプロテアーゼと該基質との反応を抑制する物質を含有するセリンプロテアーゼ抑制剤に関する。

10 背景技術

酵素は、生体細胞が生産するタンパク質性の高分子有機触媒である。この中で、セリンプロテアーゼは、セリン残基の水酸基を活性中心とするプロテアーゼであり、動物の消化酵素であるペプシン、トリプシン、キモトリプシン；受精に際して卵の透明層を溶解するアクロシン；血液
15 の凝固や線溶に関与するトロンビン、プラスミン、活性化血液凝固第 I 因子、活性化血液凝固第 VII 因子、活性化血液凝固第 IX 因子、活性化血液凝固 X 因子、活性化血液凝固 XI 因子および活性化血液凝固第 XI 因子；炎症に関係の深いエラスターゼ等が含まれる。

ここに、トロンビンをはじめとする活性化血液凝固因子は深く血液凝
20 固に関連し、その活性の異常亢進は、播種性血管内凝固（DIC）をはじめとする血液凝固異常に直結する。又トロンビンは血小板上にある受容体に作用し血小板の凝集を促進させる働きも持つ。また、プラスミン、uPA（ウロキナーゼ）、tPA（組織プラスミノゲン活性化因子）は線溶に関連しフィブリンを分解する機能を持つがその活性亢進状態は
25 出血性素因の原因となる。さらにプラスミン、uPAは血管新生、癌細胞の増殖、ガン細胞の転移に深く関連していることも知られ、その活性

抑制は抗癌作用を持つことが知られている。

このように様々な疾患に対しセリンプロテアーゼは深く関与し、その治療においてセリンプロテアーゼ活性の阻害、抑制は非常に重要である。

このセリンプロテアーゼの触媒中心は、いずれも活性セリン残基とその近傍に存在するヒスチジン残基のイミダゾール環とアスパラギン酸残基の β -カルボキシル基電荷リレー系で構成されている。基質はプロテアーゼによって異なるが、プロテアーゼによる加水分解は、基質分子(CO-NH)のアシル成分(-CO)が、活性セリンの水酸基へ移転することによって進行する。一方、生物界には、これらプロテアーゼのある種のもものと特異的に強く結合して酵素活性を可逆的に阻害するプロテアーゼ抑制剤も存在し、それぞれのプロテアーゼ作用を制御している。したがって、セリンプロテアーゼ抑制剤を使用すれば疾病のもとになる反応系を停止させることができ、医薬品として使用することが可能である。

例えば、経口用合成トリプシン剤であるメシル酸ナファモスタットは、膵管内のトリプシンの活性を阻止することにより、腹痛などの自覚症状の軽減と高アミラーゼ血症の改善に使用されている。

また、播種性血管内凝固症候群をはじめとする血栓症の治療および予防においては、抗血小板薬や抗凝固薬などの、数多くの血栓形成予防薬が用いられている。抗凝固薬としては、従来、活性化血液凝固第II因子、活性化血液凝固第VII因子、活性化血液凝固第IX因子、および活性化血液凝固第X因子などのセリンプロテアーゼの活性を阻害するメシル酸ガベキサートやメシル酸ナファモスタットなどのセリンプロテアーゼ抑制剤が使用されている。

しかしながら、従来のセリンプロテアーゼ抑制剤である上記メシル酸ガベキサートやメシル酸ナファモスタットは、該化合物がセリンプロテ

アーゼ活性部位に結合してセリンプロテアーゼ活性を抑制するものであり、キモトリプシンなどの消化酵素を抑制すると共にこれらがトロンビンや第Xa活性を中和するために、抗凝固剤としても使用されるものである。いわば、従来のセリンプロテアーゼ抑制剤は、セリンプロテアーゼの活性領域に結合することによってセリンプロテアーゼの活性を抑制するものであったが、セリンプロテアーゼの種類による高い選択性が得られないのである。従来のセリンプロテアーゼ抑制剤は、セリンプロテアーゼの活性領域の構造が比較的類似した構造を持つことから、目的とするセリンプロテアーゼの酵素活性のみを選択的に阻害することは困難であった。

発明の開示

本発明者らは、前述の従来技術の問題点に鑑み鋭意研究を重ねた結果、該セリンプロテアーゼと競争してセリンプロテアーゼの基質に結合することによって、該セリンプロテアーゼと該基質との反応を抑制する物質を含有するセリンプロテアーゼ抑制剤であれば、目的とするセリンプロテアーゼの酵素活性のみを選択的に阻害することが可能であることを見だし、この知見に基づいて本発明を完成させた。

本発明は、下記の(1)～(5)の構成からなる。

- (1) セリンプロテアーゼと競争してセリンプロテアーゼの基質に結合することによって該セリンプロテアーゼと該基質との反応を抑制する物質を含有するセリンプロテアーゼ抑制剤。
- (2) 前記セリンプロテアーゼ抑制剤を含有する、抗血栓剤。
- (3) 前記セリンプロテアーゼ抑制剤を含有する、uPA, tPA, プラスミンの線溶酵素抑制剤。
- (4) 前記セリンプロテアーゼ抑制剤を含有する、抗消化酵素剤。

(5) 前記セリンプロテアーゼ抑制剤を含有する、播種性血管内凝固の治療剤。

本発明によれば、セリンプロテアーゼと競争してセリンプロテアーゼの基質に結合することによって該セリンプロテアーゼと該基質との反応を抑制する物質、例えば、該物質としてアンヒドロ化セリンプロテアーゼを使用すると、アンヒドロ化セリンプロテアーゼが起源となるセリンプロテアーゼの基質に対し特異的に結合するという全く新規の阻害形式により、特異的に活性を阻害する極めて生体適合性の高いセリンプロテアーゼ阻害剤である。

10

以下本発明を詳細に説明する。

本発明の第一は、セリンプロテアーゼと競争してセリンプロテアーゼの基質に結合することによって該セリンプロテアーゼと該基質との反応を抑制する物質を含有するセリンプロテアーゼ抑制剤である。

15 本発明のセリンプロテアーゼ抑制剤に含有される、「セリンプロテアーゼと競争してセリンプロテアーゼの基質に結合することによって該セリンプロテアーゼと該基質との反応を抑制する物質（以下「Ser-P抑制物質」と記述する。）」とは、抑制の対象とするセリンプロテアーゼと競争してその基質と結合し、これによってセリンプロテアーゼと基質との結合を減少させ、結果的に該セリンプロテアーゼの活性を特異的に抑制するものである。

20

本発明では、該Ser-P抑制物質は、それ自体がセリンプロテアーゼ活性を示さない物質であり、かつ該物質はセリンプロテアーゼと類似した構造であることが好ましい。ここに類似した構造とは、少なくとも基質との結合部位の構造が類似して基質との結合能を保持する場合をいう。これによって目的とするセリンプロテアーゼの基質と結合でき、結

25

果としてセリンプロテアーゼと基質との結合を減少させることができるからである。

本発明において、Ser-P抑制物質は特に限定されるものではないが、たとえば、遺伝子操作によってセリンプロテアーゼの少なくとも一つのアミノ酸を置換、付加、欠如させることによって得られた物質がある。

遺伝子操作によってセリンプロテアーゼの少なくとも一つのアミノ酸を置換、付加、欠如させることによって得られたSer-P抑制物質では、活性化血液凝固第II因子を例にとれば、①遺伝子組換え操作により活性化血液凝固第II因子の活性セリンのアミノ酸配列において1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換または付加することにより活性を失わせた物質である活性化血液凝固第II因子の変異体、②遺伝子組換え操作により活性化血液凝固第II因子の活性セリン付近のアミノ酸配列において1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換または付加することにより活性を失わせた物質である活性化血液凝固第II因子の変異体、③遺伝子組換え操作により活性化血液凝固第II因子の活性セリンのアミノ酸および該活性セリン付近のアミノ酸配列において1若しくは数個のアミノ酸が、それぞれ相互独立的に欠失、置換または付加することにより活性を失わせた物質である活性化血液凝固第II因子の変異体が挙げられる。また、他の活性化血液凝固第II因子の変異体についてもそれぞれ上記活性化血液凝固第II因子の変異体と同様に①～③に示す物質（変異体）が存在し得るものである。

また、Ser-P抑制物質としてはアンヒドロ化されたセリンプロテアーゼなどを挙げることができる。この理由は以下の通りである。

従来から、これらセリンプロテアーゼはその触媒活性が活性部位のセリン残基の水酸基にある事が知られている。しかしながら、我々は、セ

リン残基の水酸基は基質親和性において必ずしも必要ではなく、結合に対し立体障害を引き起こさない形で水酸基を取り除いたアンヒドロ誘導体は元の酵素の基質に対し触媒活性を失うものの、元のセリンプロテアーゼと同様の結合能を保持することを見出した。そして、該アンヒドロ

5 化セリンプロテアーゼは、起源となるセリンプロテアーゼと競争してその基質に結合するため、これによってセリンプロテアーゼと基質との結合を阻害し、セリンプロテアーゼ活性を抑制できるのである。なお、酵素は酵素自体の3次元構造または4次元構造に依存して基質と結合し、これゆえに基質特異性が発揮される。本発明では、特定のプロセスによ

10 るセリンプロテアーゼのアンヒドロ化処理を行うことによって、元のセリンプロテアーゼの基質特異性を保持すると共にプロテアーゼ活性のみを失わせることができるのである。これによって、起源になるセリンプロテアーゼの酵素活性の発現のみを選択的に抑制することができるのである。この点、従来の阻害剤が一般に低分子化合物であり、該阻害剤が

15 酵素と基質との結合部位内に存在する酵素活性領域に結合することで基質と酵素との結合や酵素活性の発現を阻害するものであったため、活性領域の構造が類似する酵素の全てに阻害効果を発現した。しかしながら本発明のセリンプロテアーゼ抑制剤は、基質特異性のある結合能を保持するものであるために極めて選択性が高く、かつ生体適合性の高いセリ

20 ンプロテアーゼ阻害剤となるのである。従来のセリンプロテアーゼ阻害剤がセリンプロテアーゼ活性部位に結合して酵素活性を阻害する薬剤の開発を中心としたため、1種類のセリンプロテアーゼに対する特異的な阻害剤の開発は困難であったが、本発明はこれを克服したものである。したがって、本発明において、Ser-P抑制物質は、アンヒドロ化セ

25 リンプロテアーゼであることが好ましい。

本発明において、酵素活性抑制の対象となるセリンプロテアーゼは特

に限定されるものではないが、具体的には、活性化血液凝固第 II 因子、活性化血液凝固第 VII 因子、活性化血液凝固第 IX 因子、活性化血液凝固第 X 因子、活性化血液凝固第 XI 因子、活性化血液凝固第 XII 因子等の活性化血液凝固因子；uPA, tPA, プラスミン等の線溶酵素；カリクレイン；
5 プロテイン C 等の抗凝固蛋白；トリプシン、キモトリプシン、アクロシン等の酵素を挙げることができる。しかしながらアンヒドロ化できこれによって結合能を保持したままセリンプロテアーゼ活性を失うものであればこれに限られるものではない。

本発明で使用する「アンヒドロ化セリンプロテアーゼ」とは、セリン
10 プロテアーゼの活性中心である活性セリン残基をデヒドロアラニンと置換したものである。Ser-P 抑制物質がアンヒドロ化セリンプロテアーゼであれば、上記のごとく、実質的に各セリンプロテアーゼ活性を特異的に抑制する事が可能であり、新機構の血栓形成予防薬を含むセリン
15 プロテアーゼ抑制剤として有用であるだけでなく、発酵工業や、有用蛋白精製などのそれぞれの分野におけるセリンプロテアーゼ活性の制御において、有効に使用することができる。

本発明において、セリンプロテアーゼのアンヒドロ化部位は、活性セリン残基のみであることが好ましい。これによって起源となるセリンプロテアーゼが有する基質特異的な結合能を保持できるからである。

20 アンヒドロ化セリンプロテアーゼは、特に限定されるものではないが、アンヒドロ化活性化血液凝固第 II 因子、アンヒドロ化活性化血液凝固第 VII 因子、アンヒドロ化活性化血液凝固第 IX 因子、またはアンヒドロ化活性化血液凝固第 X 因子から選ばれた 1 種以上であることが好ましい。

25 アンヒドロ化されるセリンプロテアーゼは、何れの方法で得られたものであっても構わない。具体的には、血漿より精製することにより得ら

れたセリンプロテアーゼであっても、遺伝子操作によって得られたセリンプロテアーゼであってもよい。

アンヒドロ化セリンプロテアーゼを製造する方法は、特に限定されるものではないが、

- 5 (1) 下記1～3の工程を順次行い、少なくとも回収操作を行う工程において、多価アルコールおよび糖類よりなる群より選ばれた1種以上の化合物と、塩若しくは両性電解質を共存させる方法であることが好ましい。この方法によれば、基質特異的な結合能を保持することができるからである。

- 10 1. セリンプロテアーゼの活性セリン残基部位と阻害剤とを反応させる工程（第1工程）

2. アルカリ処理を行う工程（第2工程）

3. 回収を行う工程（第3工程）

- 15 (2) 上記（1）に記載の製造方法において、アルカリ処理を行う工程がpH 11.0～13.5の範囲で行われることを特徴とするものである。

- 20 (3) 上記（1）または（2）に記載の製造方法において、前記多価アルコールおよび糖類よりなる群から選ばれてなる少なくとも1種の化合物が、グリセリン、エチレングリコールおよびショ糖よりなる群から選ばれてなる少なくとも1種の化合物であることを特徴とするものである。

- 25 (4) 上記（1）～（3）のいずれか1つに記載の製造方法において、前記塩もしくは両性電解質が、塩化ナトリウム、塩化カリウムおよびグリシンよりなる群から選ばれてなる少なくとも1種の化合物であることを特徴とするものである。

- (5) 上記（1）～（4）のいずれか1つに記載の製造方法におい

て、前記多価アルコールおよび糖類よりなる群から選ばれてなる少なくとも1種の化合物は、気温23℃、相対湿度50%の環境下において、液体である場合は体積比で、粉体、粒体または固体である場合は質量比で、全体に対する割合が5%以上であることを特徴とするものである。

- 5 (6) 上記(1)～(5)のいずれか1つに記載の製造方法において、前記塩もしくは両性電解質の濃度が、0.2M以上であることを特徴とするものである。

上記製造方法につき、以下により詳細に説明する。

上記アンヒドロ化セリンプロテアーゼの製造方法は、

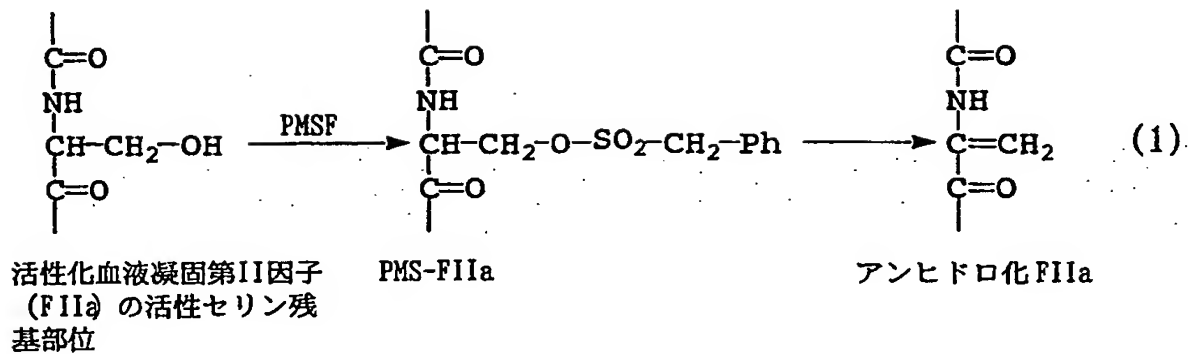
- 10 1. セリンプロテアーゼの活性セリン残基部位と阻害剤とを反応させる工程(第1工程)
2. アルカリ処理を行う工程(第2工程)
3. 回収を行う工程(第3工程)

を含み、かつ前記各工程を順次行うものであって、

- 15 少なくとも回収操作を行う工程において、多価アルコールおよび糖類よりなる群から選ばれてなる少なくとも1種の化合物と塩もしくは両性電解質を共存させることを特徴とするものである。

該製造方法について、セリンプロテアーゼとして活性化血液凝固第ⅠⅠ因子、阻害剤としてフェニルメタンスルホニルフルオリド(PMS

20 F)を使用した場合を例にとって説明すれば、下記反応式(1)として表すことができる。



以下、上記アンヒドロ化セリンプロテアーゼの製造方法を上記1～3の工程に従って説明する。

(1) 第1工程

- 5 第1工程では、セリンプロテアーゼを合成阻害剤と反応させて、セリンプロテアーゼの活性セリン残基とエステル結合を形成せしめてセリンプロテアーゼ活性を失わせる目的で、セリンプロテアーゼの活性セリン残基部位を合成阻害剤と反応させるものである。

- 10 ここで、上記セリンプロテアーゼとしては、特に制限されるものでなく、既に市販されている各種の活性化血液凝固因子（活性化血液凝固第II因子、活性化血液凝固第VII因子、活性化血液凝固第IX因子、活性化血液凝固第X因子、活性化血液凝固第XI因子、活性化血液凝固第XII因子など）、線溶酵素、カリクレイン、および抗凝固蛋白などをそのまま用いることができるほか、従来公知の各種精製方法を利用して精製
- 15 されてなる製品等を使用することができる。

- また、上記合成阻害剤としては、上記反応式に例示したように、セリンプロテアーゼの活性セリン残基と反応してエステル結合を形成することのできるものであれば、特に制限されるものではなく、例えば、PMSF、2-フェニルエタン-1-スルホニルフルオリド、メタンスルホニルフルオリド、p-トルエンスルホニル（トシル）フルオリドなどの
- 20 各種のスルホニルフルオリド、トシルクロリド、ジイソプロピルフルオ

ロリン酸（以下、DFPともいう）、3,4-ジクロロイソクマリン
（以下、3,4-DCIともいう）、L-1-クロロ-3-[4-トシル
ルアシド]-7-アミノ-2-ヘプタノン-塩酸（以下、TLCKとも
いう）、L-1-クロロ-3-[4-トシルアシド]-4-フェニル-
5 2-ブタノン（以下、TPCKともいう）などが挙げられる。

これら合成阻害剤を添加する際には、該阻害剤をあらかじめメタノール、アセトン、エタノール、プロパノール、イソプロパノール、ブタノール、プロパン-2-オール、アセトン、ジメチルホルムアミド、ジメチルスルホキシドなどの溶媒に溶解したものをを用いてもよい。また、合
10 成阻害剤を添加する際には、過剰な添加によるその後の分離除去操作の煩わしさを低減し、また反応性を高めるため、セリンプロテアーゼの活性を3%以下、より好ましくは1%以下になるまで、確認しながら行うことが望ましい。

さらに、反応溶媒としては、セリンプロテアーゼの生存にも良好なよ
15 うに、浸透圧やイオンの平衡を調節する目的でNaClが調合された塩類溶液、あるいはさらに K^+ 、 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} などのイオンを数種加えた組成のものが調合された塩類溶液であって、さらにpHを安定に維持するように緩衝系としてpH2~10、好ましくはpH4~8を示す緩衝液から任意に選ばれたものを加えたものであれば良い。こうした緩衝液
20 としては、例えば、リン酸緩衝液、炭酸塩緩衝液、重炭酸塩緩衝液、トリス緩衝液、クエン酸-リン酸ナトリウム緩衝液、コハク酸-水酸化ナトリウム緩衝液、フタル酸カリウム-水酸化ナトリウム緩衝液、イミダゾール-塩酸緩衝液、ホウ酸緩衝液、生理的塩類溶液あるいはグッドの緩衝液などを挙げることができる。

25 また、反応条件としては、一般に熱的变化がセリンプロテアーゼの安定化にも大きく影響することから、反応温度は-30~50℃、好まし

くは4～40℃の範囲で行うことが望ましい。

上記反応により得られた生成物は、従来公知の方法を用いて精製分離を行う。

精製分離に用いられる方法としては、特に制限されるものでなく、例えば、ゲル濾過、イオン交換クロマトグラフィー、アフィニティクロマトグラフィー、限外濾過膜、透析などが挙げられる。代表的なゲル濾過について説明すれば、反応後の溶液を、溶媒で膨潤させたゲル（例えば、セファデックス、バイオゲル、アガロースゲルなど）粒子のカラムに添加し溶媒を流し続けることで、まず高分子溶質のセリンプロテアーゼ生成物、遅れて低分子溶質の合成阻害剤などが溶出し両者が分離されるものである。ここで使用することのできる溶媒としては、セリンプロテアーゼの生存にも良好なように、浸透圧やイオンの平衡を調節する目的でNaClが調合された塩類溶液、あるいはさらに K^+ 、 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} などのイオンを数種加えた組成のものが調合された塩類溶液であって、さらにpHを安定に維持するように緩衝系としてpH2～10、好ましくはpH4～8を示す緩衝液を加えたものであれば良い。こうした緩衝液としては、例えば、リン酸緩衝液、炭酸塩緩衝液、重炭酸塩緩衝液、トリス緩衝液、クエン酸－リン酸ナトリウム緩衝液、コハク酸－水酸化ナトリウム緩衝液、フタル酸カリウム－水酸化ナトリウム緩衝液、イミダゾール－塩酸緩衝液、ホウ酸緩衝液、生理的塩類溶液あるいはグッドの緩衝液などを挙げることができる。

(2) 第2工程および第3工程

第2、第3工程では、エステル結合を解離させると共にセリン残基をアラニン残基に交換して、上記アンヒドロ化セリンプロテアーゼを製造し、さらに高pH領域から中性付近にpHを戻して再生する間に、凝集・会合を起こさずに簡便な操作によって該アンヒドロ化セリンプロテ

アーゼを高収率で得る目的で、第1工程で精製分離されたセリンプロテアーゼ生成物に対し、アルカリ処理を行う工程（第2工程）と、回収操作を行う工程（第3工程）を順次行うものであって、少なくとも回収操作を行う工程において、多価アルコールおよび糖類よりなる群から選ば
5 れてなる少なくとも1種の化合物と塩もしくは両性電解質を共存させることを特徴とするものである。

まず、第1工程で精製分離されたセリンプロテアーゼ生成物を溶解させる溶媒としては、セリンプロテアーゼの生存にも良好なように、浸透圧やイオンの平衡を調節する目的でNaClが調合された塩類溶液、あ
10 るいはさらに K^+ 、 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} などのイオンを数種加えた組成のものが調合された塩類溶液であって、さらにpHを安定に維持するように緩衝系としてpH2～10、好ましくはpH4～8を示す緩衝液から任意に選ばれたものを加えたものであれば良い。こうした緩衝液としては、
例えば、リン酸緩衝液、炭酸塩緩衝液、重炭酸塩緩衝液、トリス緩衝液、
15 クエン酸－リン酸ナトリウム緩衝液、コハク酸－水酸化ナトリウム緩衝液、フタル酸カリウム－水酸化ナトリウム緩衝液、イミダゾール－塩酸緩衝液、ホウ酸緩衝液、生理的塩類溶液あるいはグッドの緩衝液などを挙げる事ができる。

また、上記アンヒドロ化セリンプロテアーゼの製造に使用される多価
20 アルコールおよび糖類よりなる群から選ばれてなる少なくとも1種の化合物は、塩もしくは両性電解質との併用により高pH領域でのアルカリ処理において、蛋白の凝集・会合を起こさずアンヒドロ化を促進し、回収操作において、高pH領域から中性付近にpHをもどす際に、凝集・会合を起こさずアンヒドロ化セリンプロテアーゼを再生する目的で添加
25 するものである。ただし、回収操作にのみ用いても上記アンヒドロ化セリンプロテアーゼの製造の目的を達成し得るものである。

上記多価アルコールおよび糖類よりなる群から選ばれてなる少なくとも1種の化合物としては、例えば、テトリトール（具体的には、エリトリトール、D-スレイトール、L-スレイトール、D, L-スレイトール）、ベンチトール（具体的には、リビトール、D-アラビニトール、L-アラビニトール、D, L-アラビニトール、キシリトール）、ヘキシトール（具体的には、アリトール、ダルシトール（ガラクトール）、ソルビトール（D-グルシトール）、L-グルシトール、D, L-グルシトール、D-マンニトール、L-マンニトール、D, L-マンニトール、D-アルトリトール、L-アルトリトール、D, L-アルトリトール、D-イジトール、L-イジトール）、ヘプチトール、マルチトール、ラクチトール、グリセリン、エチレングリコール、ジエチレングリコール、トリエチレングリコール、プロピレングリコール、ジプロピレングリコール、1, 3-ブチレングリコール、ネオペンチルグリコール、ペンタメチレングリコール、ヘキサメチレングリコール、ペンタエリトリトール、ジペンタエリトリトール、トリペンタエリトリトール、トリメチロールエタン、トリメチロールプロパン、無水エンネアヘプチトール、1, 4-ブタンジオール、1, 2, 4-ブタントリオールおよび1, 2, 6-ヘキサントリオールなどの多価アルコール（糖アルコールを含む）、グリセリンアルデヒドジオキシアセトン、トレオース、エリトルロース、エリトロース、アラビノース、リブロース、リボース、キシロース、キシルロース、リキソース、グルコース、フルクトース、マンノース、イドース、ソルボース、グロース、タロース、タガトース、ガラクトース、アロース、プシコース、アルトロースおよびショ糖などの糖類などが挙げられる。これらは1種単独若しくは2種以上を混合して用いることができる。なかでも、グリセリン、エチレングリコールおよびショ糖よりなる群より選ばれてなる少なくとも1種の化合物が好ましい。

また、上記多価アルコールおよび糖類よりなる群から選ばれてなる少なくとも1種の化合物は、気温23℃、相対湿度50%の環境下において、液体である場合は体積比で、粉体、粒体または固体である場合は質量比で、全体に対する割合が5%以上、好ましくは15%以上であることが望ましい。ただし、全体に対する割合が5%未満であっても、併用する塩もしくは両性電解質の濃度を相対的に高めることにより、第2～第3工程を行うことは可能であり、所望の効果を有効に発現できる。よって、上記多価アルコールおよび糖類よりなる群から選ばれてなる少なくとも1種の化合物の全体に対する割合（濃度）は、その種類に応じて、
10 所望の効果を有効に発現できるように適当な濃度を適宜決定することが望ましく、かかる決定に際しては併用する塩もしくは両性電解質の種類や濃度を考慮する必要がある。

上記アンヒドロ化セリンプロテアーゼの製造に使用される塩もしくは両性電解質は、上記多価アルコールおよび糖類よりなる群から選ばれて
15 なる少なくとも1種の化合物との併用により高pH領域でのアルカリ処理において、蛋白の凝集・会合を起こさずアンヒドロ化を促進し、回収操作において、高pH領域から中性付近にpHを戻す際に、凝集・会合を起こさず、アンヒドロ化セリンプロテアーゼを再生する目的で添加されるものであって、かかる目的を得るに適した塩濃度（イオン強度）、
20 誘電率が得られるならば特に制限されるものではなく、有機、無機は限定されるものではない。

よって、上記塩もしくは両性電解質としては、例えば、塩化ナトリウム、塩化カリウム等のハロゲン化アルカリ金属、塩化マグネシウム、塩化カルシウム等のハロゲン化アルカリ土類金属、塩化アンモニウム、硫酸アンモニウム、炭酸ナトリウム、炭酸カリウム、炭酸マグネシウム、
25 炭酸アンモニウム、炭酸カルシウム、炭酸水素ナトリウム、炭酸水素カ

- ルシウム、炭酸水素カリウム、炭酸水素アンモニウム、リン酸ナトリウム、リン酸水素二ナトリウム、リン酸二水素カリウム、リン酸水素二アンモニウム、ホウ酸ナトリウム、ホウ酸カリウムなどの無機酸塩、クエン酸ナトリウム、クエン酸カリウム、クエン酸マグネシウム、クエン酸カルシウム、クエン酸アンモニウム、フタル酸ナトリウム、フタル酸カリウム、フタル酸マグネシウム、フタル酸カルシウム、フタル酸アンモニウム、コハク酸ナトリウム、コハク酸カリウム、コハク酸マグネシウム、コハク酸カルシウム、コハク酸アンモニウム、酢酸ナトリウム、酢酸カリウム、酢酸カルシウム、酢酸マグネシウム、酢酸アンモニウム等の有機酸塩、グリシン、アラニン等の両性電解質となるアミノ酸などの水に可溶な塩もしくは両性電解質が挙げられる。これらは1種単独若しくは2種以上を混合して用いることができる。なかでも、水に易溶で、併存する上記多価アルコールおよび糖類よりなる群から選ばれてなる少なくとも1種の化合物の濃度に応じて最適なイオン強度（塩濃度）、誘電率に容易に調整でき、さらに精製分離工程（例えば透析など）が容易（ないし簡略化できるもの）である低分子のアルカリ金属塩や無機塩類、両性電解質などが望ましく、具体的には、塩化ナトリウム、塩化カリウムおよびグリシンよりなる群から選ばれてなる少なくとも1種の化合物が望ましいといえる。
- また、上記塩もしくは両性電解質の濃度は、0.2 M以上、好ましくは0.5 M以上とすることが望ましい。ただし、当該濃度が0.2 M未満であっても、上述した多価アルコールおよび糖類よりなる群から選ばれてなる少なくとも1種の化合物の場合と同様に当該化合物の全体に対する割合を相対的に高めることにより、第2～第3工程を行うことは可能であり、所望の効果を有効に発現できる。

第2工程において、アルカリで処理してアンヒドロ化する（すなわち、

第1工程で精製分離されたセリンプロテアーゼ生成物に対してエステル結合を解離させると共にセリン残基をアラニン残基に交換して、アンヒドロ化セリンプロテアーゼを製造する)には、反応系のpHが11.0以上、好ましくはpHが11.0~13.5の範囲となるように、アルカリを添加して調整し(さらに、必要に応じて、上述した多価アルコールおよび糖類よりなる群から選ばれてなる少なくとも1種の化合物と塩もしくは両性電解質の共存下で)、反応温度-30~50℃、好ましくは4~40℃の範囲を保持する。上記pHが11.0未満の場合には、脱PMSF反応が起こらずアンヒドロ化が進行せず好ましくない。上記

5 アルカリとしては、例えば、水酸化ナトリウム、水酸化カリウムなどの1価の塩基、水酸化カルシウム、水酸化バリウム、酸化カルシウム、酸化マグネシウム、炭酸カルシウム、炭酸ナトリウムなどの2価の塩基、水酸化鉄などの3価の塩基などを挙げることができる。上記反応温度が

10 -30℃未満の場合には、反応系が凍結する可能性があり好ましくなく、

15 一方、50℃を超える場合には、セリンプロテアーゼが蛋白変性を受け、その後の再生操作によっても元の状態に戻らなくなるなど好ましくない。

次に、第3工程において、上記アルカリ処理により合成されたアンヒドロ化セリンプロテアーゼを含む溶液は、その後(アンヒドロ化反応後)、上述した多価アルコールおよび糖類よりなる群から選ばれてなる

20 少なくとも1種の化合物と塩もしくは両性電解質の共存下で再生操作により元の状態(立体構造状態)に戻される。該再生操作としては、特に制限されるものでなく、従来公知の方法を利用することができ、例えば、反応後の系(溶液)のpHを4~10の範囲に溶媒(上記アンヒドロ化反応で用いたと同種の溶媒などが使用できる)にて調整し、-30~5

25 0℃の温度範囲で一定時間保持する方法、透析によりpHを4~10の範囲に調整する方法などをとることができる。

本発明のセリンプロテアーゼ抑制剤は、S e r - P 抑制物質の他、本発明の効果を損なわない範囲であれば、公知の安定剤や増量剤などの添加剤を含有してもよい。

また、本発明のセリンプロテアーゼ抑制剤は、粉状、液状、粒剤など
5 何れの形状であっても構わない。

本発明のセリンプロテアーゼ抑制剤は、S e r - P 抑制物質を少なくとも1種含むものであるが、たとえば血液凝固系のように、複数のセリンプロテアーゼが一つの現象に関連して作用している場合には、S e r - P 抑制物質を2種以上含むものであってもよい。

10 その一方、トロンピンは、フィブリノーゲン、V I I I 因子、X I I I 因子、プロテインC等を基質として結合し、それぞれを活性化することも知られているが、本発明で使用するアンヒドロトロンピンは、フィブリノーゲン、V I I I 因子、X I I I 因子、プロテインCと、それぞれ $K_d 4.4 \times 10^{-8}$ 、 $K_d 1.2 \times 10^{-8}$ 、 $K_d 2.8 \times 10^{-7}$ 、
15 $K_d 8.1 \times 10^{-5}$ で結合する。従って、例えば、血液凝固系にアンヒドロトロンピンを添加すると、トロンピンと競争してフィブリノーゲン、V I I I 因子、X I I I 因子、プロテインCに結合することによりこれら基質に対するトロンピンによる活性化を抑制することができる。この場合でも、基質特異性は保持されているといえる。このことは、血
20 液凝固系がカスケードを構成して連続的に凝固系を促進すると共に、活性化された物質が反応系の上流にある因子を更に活性化することで血液凝固をより迅速に進行させる実情に鑑みると、特定のセリンプロテアーゼ、例えばトロンピンを起源とする抑制剤であっても、各因子に相乗的に作用して血液凝固系を抑制できることを意味する。

25 加えて、血液凝固系の開始には、血液が生体にとって異物の表面と接触して開始する凝固反応系と、血管内皮以外の生体組織に血液が接触す

ることで開始されるものがある。その概略を説明すると、異物面と接触して最初に起こる凝固反応は、XII因子、XI因子の活性化が続き、更にVII因子、VII因子、IX因子の活性化が続き、更に、X因子の活性化を経てプロトロンビンがトロンビンとなりフィブリノーゲン
5 をフィブリンとする。一方、生体組織に接触する場合には、プロカリクレインや高分子キニノーゲン等の組織成分が活性化されたことで、以降にVII因子、VII因子、IX因子の活性化が続くものである。したがって、例えば、アンヒドロトロンビンを使用すると、異物面の接触による凝固系の抑制にも有効であると共に、組織の接触によって生ずる凝
10 固系の抑制にも有効である。その一方、消化酵素などの活性を抑制することが少ない。しかも、その構造から生体内物質の代謝系にて分解されるため、副作用が少ない利点がある。

また、Ser-P抑制物質が、トリプシノーゲン等の消化酵素のアンヒドロ体である場合には、トリプシノーゲンの活性化を阻止することで
15 腹痛などの自覚症状の軽減と高アミラーゼ血症の改善に有効である。

本発明のセリンプロテアーゼ抑制剤は、抗血栓剤、線溶酵素抑制剤、抗消化酵素剤、播種性血管内凝固の治療剤として有用である。

特に、従来から使用されている抗血栓療法にはワーファリン等の抗ビタミンK剤も用いられるが同時にプロテインC、プロテインS等の抗凝固として作用する蛋白質の生産をも低下させる。しかしながら、本発明
20 のセリンプロテアーゼ抑制剤によれば、血液凝固異常の治療及び管理、抗癌治療に対しその起因又は関与するセリンプロテアーゼを特異的に阻害することができる。そして、アンヒドロセリンプロテアーゼを実際に治療薬として用いた場合には、その構造が活性部位セリン残基を除き起源であるセリンプロテアーゼと類似するために生体にとって異物と認識
25 されず、免疫的問題が発生しにくい利点を持つ。

本発明のセリンプロテアーゼ抑制剤の投与形態は、筋肉注射、静脈注射などの注射剤がある。抑制のターゲットとなるセリンプロテアーゼが血液中に含有される場合、他の多くの抑制剤と同様に静脈注射による投与が望ましい。その一方、癌増殖等の抑制として用いたい場合は癌組織に直接注入する事も可能である。

更に、本発明の抑制剤は、血小板凝集阻害剤として、血小板凝集に起因する、もしくはそれを一因とする種々の疾患の治療もしくは予防に効果的である。特に播種性血管内凝固の治療剤や、心筋梗塞、脳梗塞などの血栓形成による血管の閉塞を阻害もしくは予防するする薬剤として有効である。また、心筋梗塞時の冠状動脈内血栓に対する経皮的冠状動脈形成術後の急性再閉塞阻害剤、ウロキナーゼ等の血栓溶解剤による、梗塞巣への血栓溶解療法時の放出血小板による再閉塞阻害剤として、さらに、体外への血液循環を伴う医学的処置時の、血液凝固阻害剤として有効である。

さらに、本発明血小板凝集阻害剤は、種々の疾患の治療において、前記有効成分の他に、必要に応じて他の医薬として有効な成分、例えば他の種類の血小板凝集阻害成分を含有させることもできる。

本発明の抑制剤を、抗血栓剤、線溶酵素抑制剤、抗消化酵素剤、播種性血管内凝固の治療剤として使用するにあいには、臨床投与量は、注射投与の場合、成人に対し上記有効成分として、抑制の目的となる酵素の存在量及び抑制の度合に依存するものの、1回当たり1～100000mg、より好ましくは10～50000mg、特に好ましくは100～1000mgを注射するのが好ましい。投与回数は1日1回に限られず所定量を複数回に分けて投与してもよく、また、疾患の種類や程度に応じて点滴によって投与することもできる。更に患者の年齢、症状等によって適宜投与量を増減させることもできる。前記の本発明の血小板凝集

阻害剤は、1日1回投与も可能であるが、適当な間隔をあけて所定量を2～3回に分けて投与することもできる。なお、体外循環用に本発明の化合物を用いる場合には、上記の注射剤の形態で用いることができる。投与量も上記の注射剤の投与量に準ずる。

5

発明を実施するための最良の形態

以下、本発明を、実施例をもって具体的に説明する。

実施例 1

Cohn Paste III 由来の活性化血液凝固第 II 因子 (α -トロンビン)

10 5. 21 mg を 5 mM リン酸緩衝液 / 0. 1 M NaCl / pH 6. 5
10 ml に溶解した溶液に、7 % フェニルメタンスルホニルフルオ
リド (PMSF) メタノール溶液 30 μ l を 30 分おきに総活性が 1 %
未満にまで加える。この溶液を 0 $^{\circ}$ C に冷却し、1 M NaOH を 0. 5
ml 添加し、12 分間反応させた。反応後 3 M NaCl 溶液を 5 ml
15 加え、さらに 19 g のグリセリンを加えた。

この溶液を 1 M トリス塩酸緩衝液 / 50 % グリセリン / pH 7 を用
い、pH を 7. 8 に調整し、4 $^{\circ}$ C、12 時間保持した。その後、50 m
M トリス塩酸緩衝液 / 1 M NaCl / pH 7. 5 に透析し、さらに 5
0 mM トリス塩酸緩衝液 / 0. 1 M NaCl / pH 7. 5 に透析した
20 のち、p-アミジノフェニルメタンスルホニルフルオリド (和光純薬工
業株式会社製 ; 以下、単に APMSF ともいう。) により残存活性を完
全に不活化した。この溶液を 50 mM トリス塩酸緩衝液 / 0. 1 M N
aCl / pH 7. 5 で平衡化したベンザミジンセファロースカラムに添
加した。同緩衝液で不純物ピークを完全に洗浄し、50 mM トリス塩
25 酸緩衝液 / 0. 1 M NaCl / 0. 2 M ベンザミジン / pH 7. 5 に
より溶出した。この溶液を 50 mM トリス塩酸緩衝液 / 1 M NaCl

／pH 7.5により透析しベンザミジンを除去し、アンヒドロ化活性化血液凝固第II因子（アンヒドロトロンビン）2.8mgを得た。

実施例2

人血漿由来の活性化血液凝固第VII因子2.5mgを5mM リン酸緩衝液／0.1M NaCl／pH 6.5 10mlに溶解した溶液に、7%フェニルメタンスルフォニルフルオリド（PMSF）メタノール溶液30 μ lを30分おきに総活性が1%未満にまで加える。この溶液を0℃に冷却し、1M NaOHを0.5ml添加し、1.2分間反応させた。反応後3M NaCl溶液を5ml加え、さらに19gのグリセリンを加えた。

この溶液を1M トリス塩酸緩衝液／50% グリセリン／pH 7を用い、pHを7.8に調整し、4℃、12時間保持した。その後、50mM トリス塩酸緩衝液／1M NaCl／pH 7.5に透析し、さらに50mM トリス塩酸緩衝液／0.1M NaCl／pH 7.5に透析したのち、APMSFにより残存活性を完全に不活化した。この溶液を50mM トリス塩酸緩衝液／0.1M NaCl／pH 7.5で平衡化したベンザミジンセファロースカラムに添加した。同緩衝液で不純物ピークを完全に洗浄し、50mM トリス塩酸緩衝液／0.1M NaCl／0.2M ベンザミジン／pH 7.5により溶出した。この溶液を50mM トリス塩酸緩衝液／1M NaCl／pH 7.5により透析しベンザミジンを除去し、アンヒドロ化活性化血液凝固第VII因子を1.2mg得た。

実施例3

ヒト血漿由来の活性化血液凝固第IX因子4.0mgを5mM リン酸緩衝液／0.1M NaCl／pH 6.5 10mlに溶解した液に7%フェニルメチルスルフォニルフルオリド（PMSF）メタノール溶液3

0 μ l を 30 分おきに総活性が 0.1% 未満になるまで添加した。

この溶液を 0℃ に冷却し 1M NaOH を 0.5 ml 添加し、12 分間反応させた。反応後 3M NaCl 溶液を 5 ml 添加し、さらに 1.9 g のグリセリンを添加した。

- 5 この溶液を 1M トリス塩酸緩衝液 / pH 7 を用い pH を 8 に調整し、4℃ で 12 時間放置し、その後 50 mM トリス塩酸緩衝液 / 1M NaCl / pH 7.5 4℃ で 12 時間透析した。さらにその後 50 mM トリス塩酸緩衝液 / 0.1M NaCl / pH 7.5 4℃ で 12 時間透析したのち、APMSF により残存活性を完全に不活化した。この溶液
- 10 をその後 50 mM トリス塩酸緩衝液 / 0.1M NaCl / pH 7.5 4℃ で平衡化したベンズアミジンセファロース 6B カラムに添加し同緩衝液で完全に非吸着物を洗浄後 50 mM トリス塩酸緩衝液 / 0.1M ベンズアミジン / 0.1M NaCl / pH 7.5 で溶出した。

- 透析によりベンズアミジンを除去し、アンヒドロ化活性化血液凝固第
- 15 IX 因子を約 2.1 mg 得た。

実施例 4

- ヒト血漿由来の活性化血液凝固第 X 因子 3.2 mg を 5 mM リン酸緩衝液 / 0.1M NaCl / pH 6.5 10 ml に溶解した液に 7% フェニルメチルスルフォニルフルオリド (PMSF) メタノール溶液 3
- 20 0 μ l を 30 分おきに総活性が 0.1% 未満になるまで添加した。

この溶液を 0℃ に冷却し 1M NaOH を 0.5 ml 添加し、12 分間反応させた。反応後 3M NaCl 溶液を 5 ml 添加し、さらに 1.9 g のグリセリンを添加した。

- この溶液を 1M トリス塩酸緩衝液 / pH 7 を用い pH を 8 に調整し、
- 25 4℃ で 12 時間放置し、その後 50 mM トリス塩酸緩衝液 / 1M NaCl / pH 7.5 4℃ で 12 時間透析した。さらにその後 50 mM ト

リス塩酸緩衝液／0.1M NaCl／pH7.5 4℃で12時間透析したのち、APMSFにより残存活性を完全に不活化した。この溶液をその後50mM トリス塩酸緩衝液／0.1M NaCl／pH7.5 4℃で平衡化したベンズアミジンセファロース6Bカラムに添加し同緩衝液で完全に非吸着物を洗浄後50mM トリス塩酸緩衝液／0.1M ベンズアミジン／0.1M NaCl／pH7.5で溶出した。

透析によりベンズアミジンを除去し、アンヒドロ化活性化血液凝固第X因子を約1.4mg得た。

実施例5

10 人全血20mlに上記実施例1で製造されたアンヒドロ化活性化血液凝固第II因子を5mg／1ml (5mM, Tris-HCl, 0.15M NaCl, pH7.5) 加え、トロンボエラストグラムによる凝固時間を測定したところ、アンヒドロ化活性化血液凝固第II因子を加えない場合 (1ml, 5mM Tris-HCl, 0.15M NaCl, pH7.5 添加)と比較し凝固時間が約3倍に延長された。

実施例6

人全血20mlに上記実施例2で製造されたアンヒドロ化活性化血液凝固第VII因子を0.5mg／1ml (5mM, Tris-HCl, 0.15M NaCl, pH7.5) 加え、トロンボエラストグラムによる凝固時間を測定したところ、アンヒドロ化活性化血液凝固第VII因子を加えない場合 (1ml, 5mM Tris-HCl, 0.15M NaCl, pH7.5 添加)と比較し凝固時間が約2.1倍に延長された。

実施例7

人全血20mlに上記実施例3で製造されたアンヒドロ化活性化血液凝固第IX因子を0.5mg／1ml (5mM Tris-HCl, 0.15M NaCl, pH7.5) 加え、トロンボエラストグラムによる凝固時間を測定したところ、

アンヒドロ化活性化血液凝固第 IX 因子を加えない場合 (1 ml, 5 mM Tris-HCl, 0.15M NaCl, pH7.5 添加) と比較し凝固時間が約 3 倍に延長された。

実施例 8

- 5 人全血 20 ml に上記実施例 4 で製造されたアンヒドロ化活性化血液凝固第 X 因子を 0.5 mg / 1 ml (50 mM Tris-HCl, 0.15M NaCl, pH7.5) 加え、トロンボエラストグラムによる凝固時間を測定したところ、アンヒドロ化活性化血液凝固第 X 因子を加えない場合 (1 ml, 50 mM Tris-HCl, 0.15M NaCl, pH7.5 添加) と比較し凝固時間が約 1.8 倍に
- 10 延長された。

産業上の利用可能性

- 本発明のセリンプロテアーゼ抑制剤であれば、目的とするセリンプロテアーゼの酵素活性のみを選択的に阻害することが可能であり、新機構
- 15 の血栓形成予防薬として有用であるだけでなく、発酵工業や、有用蛋白精製などのそれぞれの分野におけるセリンプロテアーゼ活性の制御において、有効に使用することができる。

請求の範囲

1. セリンプロテアーゼと競争してセリンプロテアーゼの基質に結合することによって該セリンプロテアーゼと該基質との反応を抑制する物質を含有するセリンプロテアーゼ抑制剤。

2. セリンプロテアーゼと競争してセリンプロテアーゼの基質に結合することによって該セリンプロテアーゼと該基質との反応を抑制する物質が、セリンプロテアーゼ活性を示さないセリンプロテアーゼと類似した構造を持つ物質である請求項1に記載のセリンプロテアーゼ抑制剤。

3. セリンプロテアーゼと競争してセリンプロテアーゼの基質に結合することによって該セリンプロテアーゼと該基質との反応を抑制する物質が、遺伝子操作によってセリンプロテアーゼの少なくとも一つのアミノ酸を置換、付加、欠如させることによって得られた物質である請求項1または2に記載のセリンプロテアーゼ抑制剤。

4. セリンプロテアーゼと競争してセリンプロテアーゼの基質に結合することによって該セリンプロテアーゼと該基質との反応を抑制する物質が、アンヒドロ化セリンプロテアーゼである請求項1または2に記載のセリンプロテアーゼ抑制剤。

5. 該アンヒドロ化セリンプロテアーゼが、アンヒドロ化された活性化血液凝固第II因子、アンヒドロ化された活性化血液凝固第VII因子、アンヒドロ化された活性化血液凝固第IX因子およびアンヒドロ化された活性化血液凝固第X因子から選ばれた1種以上である請求項4に記載のセリンプロテアーゼ抑制剤。

6. 該アンヒドロ化セリンプロテアーゼのアンヒドロ化部位が、活性セリン残基のみである請求項4または5に記載のセリンプロテアーゼ抑制剤。

7. 該アンヒドロ化セリンプロテアーゼが、

(1) セリンプロテアーゼの活性セリン残基部位と阻害剤とを反応させる工程、

(2) アルカリ処理を行う工程、

5 (3) 回収操作を行う工程、

を含み、かつ前記工程を順次行い、少なくとも回収操作を行う工程において、多価アルコールおよび糖類よりなる群より選ばれた1種以上の化合物と、塩若しくは両性電解質を共存させる方法で得られたものである請求項4～6の何れか1項に記載のセリンプロテアーゼ抑制剤。

10 8. 該アルカリ処理を行う工程がpH 11.0～13.5の範囲で行われる請求項7に記載のセリンプロテアーゼ抑制剤。

9. セリンプロテアーゼと競争してセリンプロテアーゼの基質に結合することによって該セリンプロテアーゼと該基質との反応を抑制する物質を2種以上含有する請求項1～4の何れか1項に記載のセリンプロ
15 テアーゼ抑制剤。

10. 請求項1～9のいずれか1項に記載のセリンプロテアーゼ抑制剤を含有する、抗血栓剤。

11. 請求項1～9のいずれか1項に記載のセリンプロテアーゼ抑制剤を含有する、線溶酵素抑制剤。

20 12. 請求項1～9のいずれか1項に記載のセリンプロテアーゼ抑制剤を含有する、抗消化酵素剤。

13. 請求項1～9のいずれか1項に記載のセリンプロテアーゼ抑制剤を含有する、播種性血管内凝固の治療剤。

国際調査報告

(法 8 条、法施行規則第 40、41 条)
[P C T 1 8 条、P C T 規則 43、44]

出願人又は代理人 の書類記号 F2000-55-PCT	今後の手続きについては、国際調査報告の送付通知様式(PCT/ISA/220) 及び下記 5 を参照すること。	
国際出願番号 PCT/JPO0/04595	国際出願日 (日.月.年) 10.07.00	優先日 (日.月.年) 08.07.99
出願人 (氏名又は名称) 藤森工業株式会社		

国際調査機関が作成したこの国際調査報告を法施行規則第 41 条 (PCT 18 条) の規定に従い出願人に送付する。
この写しは国際事務局にも送付される。

この国際調査報告は、全部で 3 ページである。

☐ この調査報告に引用された先行技術文献の写しも添付されている。

1. 国際調査報告の基礎

a. 言語は、下記に示す場合を除くほか、この国際出願がされたものに基づき国際調査を行った。

☐ この国際調査機関に提出された国際出願の翻訳文に基づき国際調査を行った。

b. この国際出願は、ヌクレオチド又はアミノ酸配列を含んでおり、次の配列表に基づき国際調査を行った。

☐ この国際出願に含まれる書面による配列表

☐ この国際出願と共に提出されたフレキシブルディスクによる配列表

☐ 出願後に、この国際調査機関に提出された書面による配列表

☐ 出願後に、この国際調査機関に提出されたフレキシブルディスクによる配列表

☐ 出願後に提出した書面による配列表が出願時における国際出願の開示の範囲を超える事項を含まない旨の陳述書の提出があった。

☐ 書面による配列表に記載した配列とフレキシブルディスクによる配列表に記載した配列が同一である旨の陳述書の提出があった。

2. ☐ 請求の範囲の一部の調査ができない (第 I 欄参照)。

3. ☐ 発明の単一性が欠如している (第 II 欄参照)。

4. 発明の名称は ☒ 出願人が提出したものを承認する。

☐ 次に示すように国際調査機関が作成した。

5. 要約は ☒ 出願人が提出したものを承認する。

☐ 第 III 欄に示されているように、法施行規則第 47 条 (PCT 規則 38.2(b)) の規定により国際調査機関が作成した。出願人は、この国際調査報告の発送の日から 1 カ月以内にこの国際調査機関に意見を提出することができる。

6. 要約書とともに公表される図は、

第 _____ 図とする。 ☐ 出願人が示したとおりである。

☒ なし

☐ 出願人は図を示さなかった。

☐ 本図は発明の特徴を一層よく表している。

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl. A61K45/00, 38/36, A61P7/02, 7/04, 1/00, 43/00

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl. A61K45/00, 38/36, A61P7/02, 7/04, 1/00, 43/00

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

CAPLUS (STN), BIOSIS (STN), MEDLINE (STN)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X Y	Suidan, Hana S., et al., 'The serine protease granzyme A does not induce platelet aggregation but inhibits reponses triggered by thrombin' Biochem. J., 1996, Vol.315, No.3, p.939-945	1, 2, 9, 10, 13 3-8, 12
X Y	Olson, Steven T., et al., 'Role of the catalytic serine in the interactions of serine proteinases with protein inhibitors of the serpin family. Contribution of a covalent interaction to the binding energy of serpin-proteinase complexes, J. Biol. Chem. 1995, Vol.270, No.50, p.30007-17	1, 2, 4-6, 9, 10, 13 3, 7, 8, 11, 12

☒ C欄の続きにも文献が列举されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

22. 09. 00

国際調査報告の発送日

03.10.00

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

新留 豊



4C

9639

電話番号 03-3581-1101 内線 3452

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	Harmon J. T. and Jamieson G. A., 'Activation of platelets by alpha-thrombin is a receptor-mediated event. D-phenylalanyl-	1, 2, 4-6, 9,
Y	L-prolyl-L-arginine chloromethyl ketone-thrombin, but not N alpha-tosyl-L-lysine chloromethyl ketone-thrombin, binds to the high affinity thrombin receptor' J. Biol. Chem., 1986, Vol. 261, No. 34, p. 15928-33	10, 13 3, 7, 8, 11, 12
X	Ashton R. W. and Scheraga H. A., 'Preparation and	1, 2, 4-6
Y	characterization of anhydrothrombin' Biochemistry, 1995, Vol. 34, No. 19, p. 6454-63	3, 7-13
X	Tomono, T., 'Preparation of anhydrothrombin and its interact	1, 2, 4-6
Y	ion with plasma antithrombin III' Nippon Ketsueki Gakkai Zasshi (Acta Haematologica Japonica), 1986, Vol. 49, No. 4, p. 969-79	3, 7-13
Y	EP, 882789, A2 (Fujimori Kogyo Co., Ltd.), 9.12月.1998 (09.12.98), 全文参照 & JP, 11-049800, A & US, 5939304, A	1, 2, 4-13
Y	Pei G. et al., 'Expression, isolation, and characterization of an active site (serine 528----alanine) mutant of recombinant bovine prothrombin' J. Biol. Chem., 1991, Vol. 266, No. 15, p. 9598-9604	1-3, 9-13
Y	日経バイオテク編, 「日経バイオ最新用語辞典 第四版」, 日経BP社, 1995, 第379頁「セリン・プロテアーゼ」の項 (セリンプロテアーゼには消化酵素や, 血液凝固, 血栓溶解作用を持つ酵素がある旨の記載参照)	10-13
Y	Goodman & Gilman's 'The Pharmacological Basis of Therapeutics' Ninth Ed., McGraw-Hill, p. 1341-1359	10, 11, 13